

# **Die Regulation der Zellproliferation über erbB-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen bei c-erbB2-Überexpression**

Dissertation zur Erlangung  
des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV – Chemie und Pharmazie  
der Universität Regensburg



vorgelegt von  
**Simone Diermeier**  
aus Schwandorf  
August 2004

Diese Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. C. Steinem.

Promotionsgesuch eingereicht am: 19.08.2004

Tag der mündlichen Prüfung: 28.09.2004

**Prüfungsausschuss:** Prof. Dr. C. Steinem

Prof. Dr. R. Knüchel-Clarke

Prof. Dr. S. Schneuwly

**Vorsitzender:** Prof. Dr. M. Liefländer

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Februar 2002 bis August 2004 am Institut für Pathologie, Direktor Prof. Dr. F. Hofstädter, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Knüchel-Clarke (seit April 2003: Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Aachen) unter Betreuung durch Dr. Gero Brockhoff am Universitätsklinikum Regensburg.

Für

Marco und meine Eltern

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	REZEPTOR-TYROSIN-KINASEN (RTK) DER ERBB-FAMILIE	1
1.1.1	<i>Liganden der erbB-Rezeptoren und Rezeptor-Aktivierung</i>	3
1.1.2	<i>ErbB-Rezeptor-induzierte Signaltransduktion</i>	5
1.2	DIE ROLLE DER ERBB-REZEPTOREN FÜR WACHSTUM, ENTWICKLUNG, DIFFERENZIERUNG UND DER ENTSTEHUNG VON MALIGNITÄT	7
1.2.1	<i>Die Rezeptoren der erbB-Familie im Normalgewebe</i>	7
1.2.2	<i>Die Rezeptoren der erbB-Familie in der Onkologie</i>	8
1.2.3	<i>Bedeutung der erbB-Rezeptoren für die Tumorthherapie</i>	9
1.2.4	<i>EGFR und c-erbB2 Expression im Mammakarzinom</i>	10
1.3	ZIELSETZUNG	12
<b>2</b>	<b>THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....</b>	<b>14</b>
2.1	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE FLUORESZENZANALYTIK	14
2.1.1	<i>Das Durchflusszytometer FACSCalibur</i>	15
2.1.2	<i>Das Durchflusszytometer FACStar<sup>PLUS</sup></i>	16
2.1.3	<i>Farbstoffe</i>	16
2.1.4	<i>Standardsoftware</i>	17
2.1.5	<i>Datendarstellung und Datenverarbeitung</i>	17
2.2	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ZELLZYKLUSANALYSE	19
2.2.1	<i>Der Zellzyklus</i>	19
2.2.2	<i>Die anti-BrdU Technik</i>	20
2.2.3	<i>Die BrdU/Hoechst-Quenching Technik</i>	22
2.3	FLUORESZENZ-RESONANZ-ENERGIE-TRANSFER	24
2.3.1	<i>Grundlagen</i>	24
2.3.2	<i>Berechnung der Energietransfer-Effizienz</i>	26
2.3.3	<i>Die Software AFlex (Spezialsoftware)</i>	29
<b>3</b>	<b>MATERIALIEN.....</b>	<b>30</b>
3.1	UNTERSUCHTE ZELLINIEN	30
3.2	MEDIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE ZELLKULTUR	32
3.3	ANTIKÖRPER	32
3.4	DNA-FARBSTOFFE, ENZYME UND WACHSTUMSFAKTOREN	33
3.5	GEBRAUCHSFERTIG ZUSAMMENGESTELLTE REAGENZIEN (KITS)	33
3.6	REAGENZIEN UND CHEMIKALIEN	33
3.7	PUFFER UND LÖSUNGEN	34
3.8	VERBRAUCHSMATERIAL	35
3.9	GERÄTE	35
<b>4</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>37</b>
4.1	METHODEN DER ZELLKULTIVIERUNG UND ZELLPRÄPARATIONEN	37
4.1.1	<i>Standardkultur</i>	37
4.1.2	<i>Stimulation mit Wachstumsfaktoren und Herceptin</i>	38
4.1.3	<i>BrdU-Inkubation und Zellpräparation für Pulsmarkierung</i>	39
4.1.4	<i>Analyse des Effekts einer BrdU-Pulsmarkierung auf die Zellproliferation</i>	40
4.1.5	<i>BrdU-Inkubation und Zellpräparation für BrdU/Hoechst-Quenching Technik</i>	40
4.1.6	<i>BrdU-Inkubation für die Bestimmung der G0-Phase Fraktion</i>	41
4.1.7	<i>Zellpräparation für einparametrische DNA-Färbung</i>	41
4.1.8	<i>Zellkultur und Zellpräparation für die Annexin-V-Färbung</i>	41
4.1.9	<i>Zellkultur und Zellpräparation für FRET-Analysen</i>	42

4.2	PROTEINCHEMISCHE/ IMMUNOLOGISCHE METHODEN	46
4.2.1	<i>Gewinnung von denaturierten Zellextrakten</i>	46
4.2.2	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Protein-Assay-Kit</i>	46
4.2.3	<i>Der „Sandwich“-ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay)</i>	46
4.2.4	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot</i>	49
4.3	STATISTISCHE AUSWERTUNG	51
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>52</b>
5.1	ZELLPROLIFERATION UND BRdU-SENSITIVITÄT	52
5.1.1	<i>Effekt der Langzeitinkubation mit BrdU auf die Zellproliferation</i>	52
5.1.2	<i>Effekt einer Pulsmarkierung mit BrdU auf die Zellproliferation</i>	59
5.1.3	<i>Wachstumsfaktor- und Herceptin-abhängige Zellproliferation</i>	60
5.1.4	<i>Herceptin-induzierter Exit aus dem Zellzyklus</i>	63
5.2	EGFR- UND C-ERBB2-AKTIVIERUNG/PHOSPHORYLIERUNG	64
5.2.1	<i>EGFR und c-erbB2 ELISA</i>	64
5.2.2	<i>SDS-PAGE und Western-Blot</i>	67
5.3	REZEPTOR-INTERAKTIONEN VON EGFR UND C-ERBB2	73
5.3.1	<i>EGFR Homodimerisierung</i>	73
5.3.2	<i>EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung</i>	74
5.3.3	<i>C-erbB2 Homodimerisierung</i>	76
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>77</b>
6.1	ZELLPROLIFERATION	77
6.1.1	<i>BrdU-Sensitivität</i>	78
6.1.2	<i>Wachstumsfaktor- und Herceptin-abhängige Zellproliferation</i>	80
6.2	WACHSTUMSFAKTOR- UND HERCEPTIN-ABHÄNGIGE ERBB-REZEPTOR-AKTIVIERUNG	81
6.3	WACHSTUMSFAKTOR- UND HERCEPTIN-ABHÄNGIGE ERBB-REZEPTOR-INTERAKTION	86
6.3.1	<i>EGFR Homodimerisierung</i>	87
6.3.2	<i>EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung</i>	87
6.3.3	<i>C-erbB2 Homodimerisierung</i>	90
6.4	KORRELATION DER ZELLPROLIFERATION MIT REZEPTOR-INTERAKTION UND -AKTIVIERUNG	91
6.4.1	<i>Der Effekt von Wachstumsfaktoren</i>	91
6.4.2	<i>Der Effekt von Herceptin und Wachstumsfaktoren in kombiniertem Einsatz</i>	94
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>99</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>101</b>
9.1	GERÄTEEINSTELLUNGEN DER DURCHFLUSSZYTOMETER	101
9.2	VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	102
<b>10</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>104</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 REZEPTOR-TYROSIN-KINASEN (RTK) DER ERBB-FAMILIE

Die erbB-Rezeptoren stellen eine Familie von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) dar, die als Membran-durchspannende Zelloberflächenproteine ein extrazelluläres Signal an die Tyrosin-Phosphorylierung im Inneren der Zelle koppeln (81). Damit schalten sie eine Kaskade von komplexen Signalwegen an, die zu diversen Effekten auf zellulärer Ebene führen. Bislang sind ca. 20 Subfamilien von RTK identifiziert (154), von denen eine Auswahl in Tab. 1 aufgeführt ist (111,124).

Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK)		
Nr.	Name	Funktion
1	Axl/UFO	Integrin Signalleitung
2	Eph <i>ephrin</i>	Wachstum und Differenzierung von Nervenzellen und epithelialen Zellen
3	FGFR <i>fibroblast growth factor receptor</i>	Wachstum und Differenzierung von Tumorzellen des Darms und der Prostata
4	HGFR <i>hepatocyte growth factor receptor</i>	Wachstum und Differenzierung einiger epithelialer Tumorarten
5	IR Insulin-Rezeptor	Differenzierung und Metabolismus von epithelialen Pankreaszellen
6	NGFR <i>nerve growth factor receptor</i>	Wachstum und Differenzierung von Nervenzellen
7	RET <i>rearranged during transformation</i>	Entwicklung von B Zellen und neuroendokrinen Zellen
8	PDGFR <i>platelet-derived growth factor receptor</i>	Wachstum und Differenzierung von Leukozyten und Gliazellen
9	EGFR <i>epidermal growth factor receptor</i>	Proliferation und Differenzierung von epithelialen Zellen
10	VEGFR <i>vascular endothelial growth factor receptor</i>	Vaskularisation und Angiogenese

**Tab. 1: Beispiele von Subfamilien der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und ihre Funktion (111,124,130).**

Alle Mitglieder der Familie der RTK besitzen eine einzelne Transmembran-Helix, die den zytoplasmatischen, C-terminalen mit dem extrazellulären Teil des Rezeptors verbindet (81,124). Bis auf die Familie der Insulin-Rezeptoren (Tab. 1, Nr. 5), bei der eine Disulfidbrücke zwei  $\alpha\beta$ -Einheiten kovalent verbindet, sind alle bekannten RTK Monomere (111).

So sind auch die vier erbB-Rezeptoren monomere Transmembranproteine, die hoch konserviert sind und eine starke Homologie aufweisen (Abb. 1). Die Nomenklatur für die Rezeptoren der erbB-Familie ist in der Literatur nicht einheitlich. Im Folgenden werden die Mitglieder der erbB-Rezeptorfamilie mit EGFR (*epidermal growth factor receptor*), c-erbB2, c-erbB3 und mit c-erbB4 (nach dem viralen Onkogen v-erbB des *avian erythroblastosis virus*, 108) bezeichnet (vgl. Abb. 1).

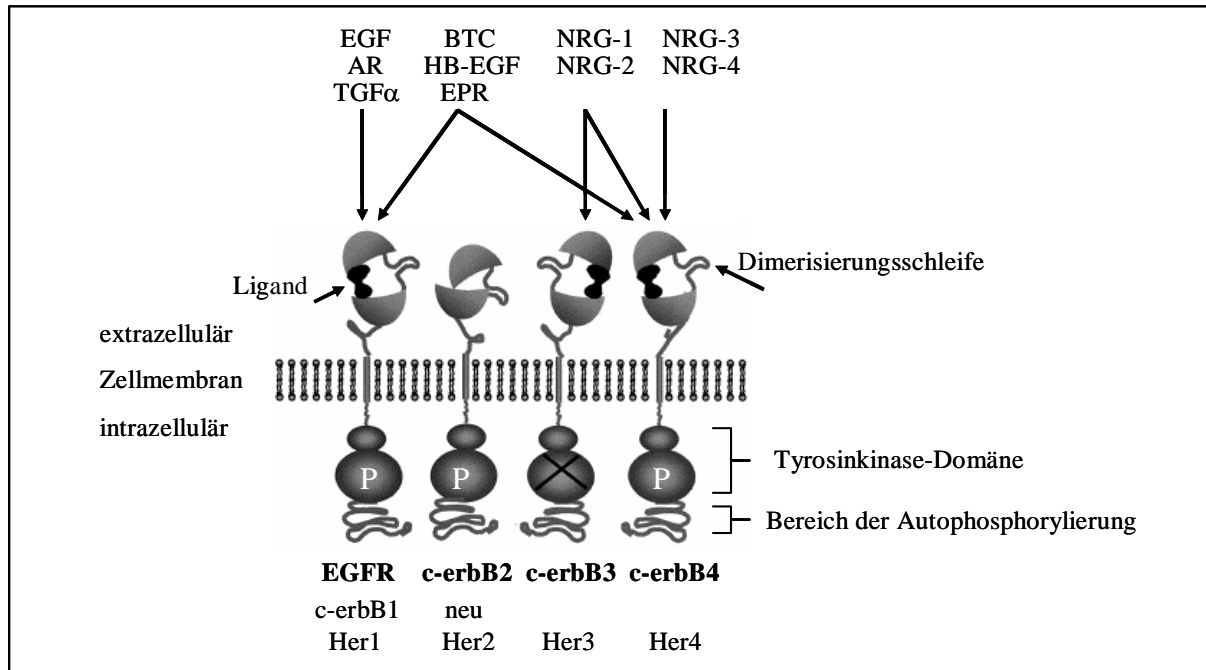


Abb. 1: Die Rezeptoren der erbB-Familie mit Synonymen und den wichtigsten Liganden. In Anlehnung an (81), verändert. Im Folgenden werden für die Mitglieder der erbB-Rezeptorfamilie die in Fettdruck gehaltenen Bezeichnungen EGFR (*epidermal growth factor receptor*), c-erbB2, c-erbB3 und c-erbB4 verwendet. Als Synonyme dienen c-erbB1 und Her1 für den EGFR, Her2/neu für c-erbB2, Her3 bzw. Her4 für c-erbB3 bzw. c-erbB4. Der epidermale Wachstumsfaktor EGF (*epidermal growth factor*), Amphiregulin (AR) und TGF $\alpha$  (*transforming growth factor- $\alpha$* ) sind Liganden des EGFR. Betacellulin (BTC), HB-EGF (*heparin-binding EGF*) und Epiregulin (EPR) binden an den EGFR und an c-erbB4. NRG1 und NRG2 sind Liganden sowohl für c-erbB3 als auch für c-erbB4. Die Neureguline NRG3 und NRG4 sind spezifisch für c-erbB4. Es konnte bislang noch kein Ligand identifiziert werden, der an c-erbB2 bindet. Dessen Dimerisierungsschleife ist jedoch auch ohne Ligandenbindung exponiert. Im Gegensatz dazu wird dieser Sequenzabschnitt bei den übrigen Mitgliedern der erbB-Familie erst durch Bindung eines Liganden zugänglich. Die Kinasedomäne des c-erbB3 Rezeptors ist katalytisch inaktiv. Her: *human epidermal growth factor receptor related receptor*, erb: benannt nach dem viralen Onkogen v-erbB des *avian erythroblastosis virus*, Neu: Neuroblastom, P: Tyrosin-Kinase (TK)-Aktivität.

Der EGFR ist das am längsten bekannte und am besten untersuchte Mitglied der erbB-Familie, sodass über ihn detaillierte Kenntnisse bezüglich der molekularen Struktur, seiner Funktion sowie der Expression in verschiedenen Geweben vorliegen (55,138). An diesem Rezeptor wurde erstmals eine intrinsische Tyrosin-Kinase (TK)-Aktivität nachgewiesen (21). Auch c-erbB2 und c-erbB4 tragen intrazellulär eine funktionsfähige TK-Domäne. Beim c-erbB3 Rezeptor ging diese Proteinkinase-Aktivität jedoch im Laufe der evolutionären Rezeptor-Diversifizierung durch Mutation in der für die Kinasedomäne kodierenden DNA-Sequenz verloren (Abb. 1) (45).

Der c-erbB2 Rezeptor ist in Anbetracht von dessen Bedeutung für die Diagnose und Therapie des Mammakarzinoms (vgl. 1.2.4) ebenfalls Gegenstand intensiver Forschung und in Bezug auf Struktur, Funktion und der gewebespezifischen Expression mittlererweile sehr gut untersucht (16,41,81,122,150). Jedoch konnte für diesen Rezeptor bislang noch kein nativer Ligand identifiziert werden. Hinweise auf einen potentiellen erbB-Liganden sind beschrieben,



aber nie bestätigt worden (78). Strukturdaten des c-erbB2 (41) lassen die Schlussfolgerung zu, dass die potentielle Ligandenbindungsstelle von c-erbB2 aufgrund struktureller und sterischer Besonderheiten nicht zur Bindung eines Liganden in der Lage ist (49,108).

Vom ursprünglich beschriebenen c-erbB4 Rezeptor wurden bislang zwei weitere Isoformen entdeckt, die durch mRNA *Splicing* generiert werden. Eine dieser Isoformen ist aufgrund einer verlängerten extrazellulären Region im Anschluss an die Transmembrandomäne anfälliger für eine proteolytische Abspaltung, die eine membranverankerte 80 kDa Form des c-erbB4 generiert (31). Dieses Fragment ist ein Substrat für eine weitere proteolytische Prozessierung, wodurch der intrazelluläre Abschnitt des c-erbB4 Rezeptors freigesetzt wird und in den Nukleus wandert (92). Die Funktion dieser nukleären Lokalisation ist noch unbekannt (14). Bei einer weiteren Isoform des c-erbB4 findet man eine Deletion eines intrazellulären Abschnitts, der eine Bindungsstelle für die PI3K (Phosphatidyl-Inositol-3'-Kinase) beinhaltet (vgl. 1.1.2) (30).

Da bei Wirbellosen mit einem Homolog des EGFR bisher nur ein einziger Vertreter dieser Rezeptorfamilie gefunden werden konnte, wird der Ursprung von c-erbB2, c-erbB3 und c-erbB4 im EGFR gesehen (59). Man geht davon aus, dass die Rezeptorfamilie durch Gendiversifizierung aus einem einzelnen Gen für den EGFR entstanden ist (2,100).

### 1.1.1 Liganden der erbB-Rezeptoren und Rezeptor-Aktivierung

Mit Ausnahme von c-erbB2 binden an die erbB-Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität und Spezifität verschiedene Wachstumsfaktoren (Abb. 1). Der epidermale Wachstumsfaktor EGF (*epidermal growth factor*), Amphiregulin (AR) und TGF $\alpha$  (*transforming growth factor- $\alpha$* ) sind Liganden ausschließlich für den EGFR. Betacellulin (BTC), HB-EGF (*heparin-binding EGF*) und Epiregulin (EPR) binden sowohl an den EGFR als auch an c-erbB4. Die Neureguline (NRG), die auch als Hereguline (HRG) oder als *neu differentiation factor* (NDF) bezeichnet werden, sind eine weitere Ligandengruppe der erbB-Rezeptoren. Während NRG1 und NRG2 Liganden für sowohl c-erbB3 als auch c-erbB4 sind, binden NRG3 und NRG4 spezifisch an den c-erbB4 Rezeptor (81).

Die erbB-Liganden werden aus Transmembranvorstufen durch proteolytische Abschaltung freigesetzt und so in den Interzellularraum abgegeben (82). Während EGF in vielen Körperflüssigkeiten vorkommt, weisen die meisten übrigen erbB-Liganden ein spezifisches Expressionsprofil für verschiedene Organe und Entwicklungsstadien auf und wirken im Allgemeinen autokrin, parakrin oder juxtakrin über kurze Distanzen (95). So wird das am

besten untersuchte Heregulin HRG1 vor allem im Nervensystem, im Herz und der Brust exprimiert (18,122).

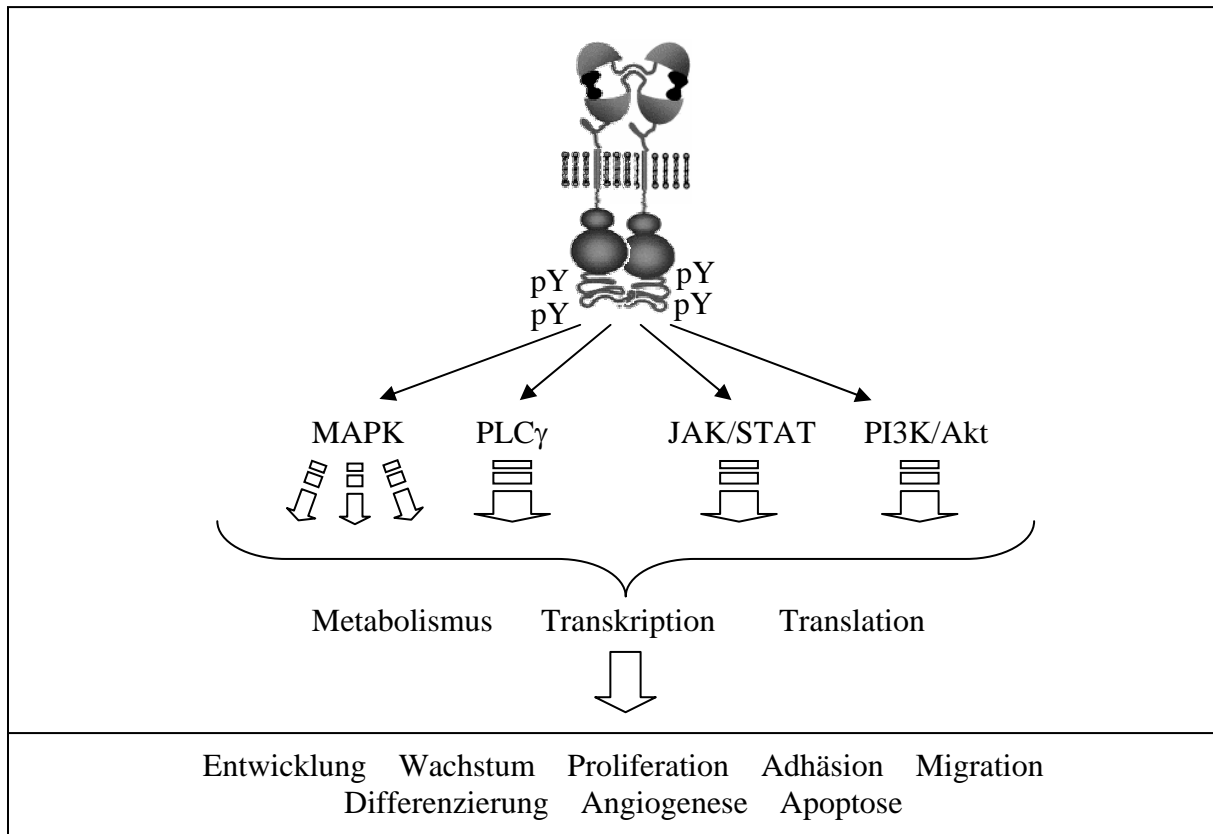
Eine weitere Möglichkeit zur Signalleitung über erbB-Rezeptoren stellt die heterologe Aktivierung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) oder Zytokinrezeptoren durch z. B. Hormone, Neurotransmitter, Lymphokine oder Stresssignale dar. Für den EGFR konnten bislang zwei Wege einer solchen sog. „Transaktivierung“ nachgewiesen werden. Ein Weg führt über die Tyrosin-Phosphorylierung des EGFR durch zytoplasmatische Proteintyrosin-Kinasen der Src-Familie und durch die Janus Kinase Jak2 (39,149). Außerdem kann eine Rezeptor-Aktivierung dadurch zustande kommen, dass heterolog angeschaltete Signalkaskaden die proteolytische Abspaltung der Transmembranvorstufen von erbB-Liganden durch Metalloproteinasen induzieren (37).

Ein wesentliches Prinzip der Signalvermittlung über die Zellmembran liegt in der lateralen, Liganden-induzierten Homo- und Heterodimerisierung der erbB-Rezeptoren. Dieser Prozess wird durch die Bindung des Liganden an die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne eingeleitet und führt zu einer Konformationsänderung im erbB-Rezeptor (108). Dadurch wird ein Sequenzbereich in der extrazellulären Domäne, die sog. „Dimerisierungsschleife“ (vgl. Abb. 1), exponiert, die die Interaktion der erbB-Rezeptoren untereinander vermittelt. Eine Ausnahme bildet hier der c-erbB2 Rezeptor, dessen Dimerisierungsschleife konstitutiv exponiert ist (41). Dies befähigt ihn, sich unabhängig von direkter Ligandenbindung mit weiteren Mitgliedern der erbB-Familie (Heterodimerisierung) oder auch mit sich selbst (Homodimerisierung) zusammenzulagern (150). Er dient dabei als Korezeptor und bevorzugter Interaktionspartner für die weiteren Mitglieder der erbB-Familie und ist in deren Liganden-gebundenem Zustand jederzeit als Dimerisierungspartner verfügbar (43). Als Heterodimerisierungspartner für EGFR, c-erbB3 und c-erbB4 verstärkt c-erbB2 außerdem die Affinität des gebundenen Liganden zum Rezeptor, was die Dauer und die Intensität der Signalleitung erhöht (56).

Die Assoziation der Rezeptoren bringt die zytoplasmatischen TK-Domänen in eine passende Orientierung, um eine gegenseitige Phosphorylierung (Transphosphorylierung) von regulatorischen Tyrosinresten in der Aktivierungsschleife des aktiven Zentrums des Dimerisierungspartners zu ermöglichen (111). Dies gibt den Zugang von ATP und Substrat zum aktiven Zentrum der RTK frei und erhöht deren basale TK-Aktivität, d. h. die Übertragung des  $\gamma$ -Phosphats aus ATP auf Tyrosinreste, was die nachgeschaltete Signaltransduktion einleitet (vgl. 1.1.2) (55,108). Man geht heute davon aus, dass die Phosphorylierung der Rezeptoren hauptsächlich gegenseitig, also *in trans* erfolgt (51,55).

### 1.1.2 ErbB-Rezeptor-induzierte Signaltransduktion

Die erbB-Rezeptoren leiten nach Liganden-induzierter Homo-/Heterodimerisierung und Phosphorylierung einen externen Stimulus über mehrere Signalwege in das Zellinnere weiter, wodurch eine hohe Diversifikation der Signaltransduktion erreicht (41) und eine spezifische zelluläre Antwort induziert wird (Abb. 2) (83).



**Abb. 2: Signalwege der erbB-Rezeptoren.** Je nach Ligand, Rezeptor und Koexpression der Rezeptoren und Effektorproteine werden verschiedene Signalwege in unterschiedlichem Ausmaß beschriftet. Dies reguliert den Metabolismus, die Transkription und die Translation von Proteinen, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, und ermöglicht die Kontrolle von Entwicklung, Wachstum, Proliferation, Adhäsion, Migration, Differenzierung, Angiogenese und Apoptose. MAPK: *mitogen-activated protein kinase*, PLC $\gamma$ : Phospholipase C $\gamma$ , JAK: Janus Kinase, STAT: *signal transducer and activator of transcription*, PI3K: Phosphatidyl-Inositol-3'-Kinase, Akt = PKB: Proteinkinase B (50,81,111,150).

Die unterschiedliche Präferenz für bestimmte Signalwege eines jeden erbB-Rezeptors rührt daher, dass jeder der vier Homologen C-terminal einen weniger konservierten Bereich aufweist. In diesem Abschnitt befinden sich Tyrosinreste mit unterschiedlicher Sequenzumgebung, die nach Transphosphorylierung durch den Dimerisierungspartner die Bindung eines Rezeptor-spezifischen Repertoires an nachgeschalteten Adaptor- und Signalproteinen erlauben (vgl. Abb. 1: Bereich der Autophosphorylierung) (55). So werden Adaptorproteine über z. B. SH2 (*Src homolog 2*)-Domänen rekrutiert und intrazelluläre Signalkaskaden (vgl. Abb. 2) aktiviert. Bei den erbB-Rezeptoren am besten untersucht ist der Ras-MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalweg, der einen mitogenen Effekt auf die

Zelle vermittelt und durch alle erbB-Liganden und erbB-Rezeptoren aktiviert wird (81). Die beiden weiteren MAPK-Signalwege über p38 und JNK/SAPK (*c-Jun amino-terminal kinase/stress-activated protein kinase*) werden ebenfalls von den erbB-Rezeptoren zur Signalweiterleitung verwendet und in Zusammenhang mit einer anti-proliferativen Zellantwort bzw. Apoptose gebracht (107,132,150). Das Ausmaß der Aktivierung des PI3K (Phosphatidyl-Inositol-3'-Kinase)/Akt-Signalwegs ist für die einzelnen erbB-Rezeptoren unterschiedlich. Der EGFR und c-erbB2 binden die p85-Untereinheit der PI3K nur indirekt über Adaptorproteine. Der c-erbB3 und c-erbB4 Rezeptor können jedoch mit sechs bzw. einer direkten p85-Bindungsstelle ein Signal effektiver an den PI3K/Akt-Signalweg weiterleiten, wodurch auf den Metabolismus und die Proteinsynthese Einfluss genommen und eine anti-apoptotische Wirkung ausgeübt wird (81,150). Weitere, den erbB-Rezeptoren nachgeschaltete Signalwege verlaufen über die Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) und die JAK/STAT (Janus Kinase/*signal transducer and activator of transcription*)-Proteine (Abb. 2) (81,111).

Eine Feinabstimmung der Signaltransduktion durch erbB-Rezeptoren wird durch zusätzliche, posttranslationale Regulationsmechanismen ermöglicht. So kann eine Phosphorylierung durch Proteinkinasen einen positiven oder negativen Einfluss auf die erbB-Rezeptoraktivität selbst nehmen (55,111) oder eine Dephosphorylierung von Effektoren der Signalweiterleitung oder der erbB-Rezeptoren selbst mittels Proteinphosphatasen die Signaltransduktion dämpfen (58,111). Eine weitere Möglichkeit zur Regulation bietet die Rezeptor-Internalisierung (*Downregulation*). Rezeptor/Ligand-Komplexe werden entweder abgebaut (Degradation, vor allem bei EGFR Homodimeren), was die Signalleitung terminiert, oder nach Abdissoziation des Liganden wieder in die äußere Zellmembran eingebaut (Rezeptor-*Recycling*, vor allem Heterodimere mit EGFR-Beteiligung) (94). Dadurch werden die Rezeptoren wieder unmittelbar für die Signalleitung zur Verfügung gestellt. Die äußerst effektive Internalisierung des EGFR wird am Beispiel der Bindung von EGF deutlich, das in *in vitro* Zellkulturen die Halbwertszeit des EGFR von 6,5 auf 1,5 Stunden vermindert (5).

Mit der Vielfalt der möglichen Signalwege und der komplexen Feinabstimmung der Signaltransduktion nehmen die erbB-Rezeptoren gezielt Einfluss auf den Metabolismus, die Transkription und die Translation von vielen, an der Regulation des Zellzyklus beteiligten Proteinen und definieren dadurch Prozesse wie Entwicklung, Wachstum, Proliferation, Adhäsion, Migration, Differenzierung, Angiogenese und Apoptose (Abb. 2) (50,81,111,150).

## 1.2 DIE ROLLE DER ERBB-REZEPTOREN FÜR WACHSTUM, ENTWICKLUNG, DIFFERENZIERUNG UND DER ENTSTEHUNG VON MALIGNITÄT

### 1.2.1 *Die Rezeptoren der erbB-Familie im Normalgewebe*

Die Rezeptoren der erbB-Familie werden zeitlich und räumlich geordnet in mesenchymalen, epithelialen und neuronalen Geweben exprimiert. Dies ermöglicht die Steuerung von Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen und die Regulation von Zellwachstum, -proliferation und Zelltod (81).

Die Bedeutung der erbB-Rezeptorfamilie in adulten Organismen spiegelt sich vor allem in epithelialen Zellschichten wider, die von der Basalzellschicht zu höheren Zelllagen hin ein definiertes Koexpressionsmuster der erbB-Rezeptoren aufweisen. Dabei wird im Besonderen dem EGFR die Aufgabe zugesprochen, das Zellwachstum und die Regeneration der epithelialen Komponenten z. B. der Haut, der Lunge oder des Gastrointestinaltrakts und damit die Gewebe-Homöostase zu steuern (150). Eine vom Entwicklungsstadium abhängige Expression der Mitglieder der erbB-Rezeptorfamilie findet sich in der Brustdrüse, deren Proliferation und Differenzierung sowohl während der Pubertät als auch während der Schwangerschaft durch die zeitlich definierte Expression der erbB-Rezeptoren und erbB-Liganden gesteuert wird (122). Dem EGFR wird dabei die Funktion zugeschrieben, das duktale Wachstum zu fördern, während c-erbB2 und c-erbB4 eine Schlüsselfunktion bei der lobuloalveolären Differenzierung und Laktation einnehmen (14,95).

Die bedeutende Rolle der erbB-Rezeptoren bei der Entwicklung und der Differenzierung von vielen weiteren Organsystemen wie z. B. des Nervensystems und des Herzens konnte mit Knockout-Mäusen belegt werden, die kurz nach der Geburt bzw. in der frühen Phase der Embryogenese aufgrund einer unzureichenden Entwicklung nicht mehr lebensfähig sind (14,81,150). Dies reflektiert die Notwendigkeit zur exakten Kontrolle der Expression und Signaltransduktion aller Mitglieder der erbB-Familie und spiegelt den Bedarf der Rezeptordiversifikation im Verlauf der Evolution wider (vgl. 1.1) (95).

### 1.2.2 *Die Rezeptoren der erbB-Familie in der Onkologie*

Die abnorme Expression und Regulation von erbB-Rezeptoren wird mit der Entwicklung und Malignität einer Vielzahl humaner Tumoren - besonders derer epithelialen Ursprungs - in Verbindung gebracht. Zur Tumorentstehung tragen

- eine Überproduktion von Liganden,
- eine dysregulierte erbB-Koexpression,

- zur konstitutiven Aktivierung führende Mutationen und Deletionen in den Genen der erbB-Rezeptoren und
- eine Rezeptor-Überexpression bei (50,95,108).

Eine wichtige Rolle in der Onkologie spielt die Überexpression der erbB-Rezeptoren. Eine Überexpression des EGFR findet sich unter anderem in Tumoren des Darms, von Kopf und Nacken und der Brust (93) und führt in epithelialen Zellen bei Anwesenheit der körpereigenen Wachstumsfaktoren zur malignen Zelltransformation (8). Eine Überexpression von c-erbB2, die vor allem beim Mamma- und Ovarialkarzinom eine große Rolle spielt, kann eine Zelltransformation unabhängig von einer Ligandenbindung bewirken (vgl. 1.1.2) (150). Die Potenzierung der c-erbB2 Signalleitung wird dabei durch die hohe c-erbB2 Rezeptordichte auf der Zelle verursacht, die nicht nur die Heterodimerisierung mit c-erbB2 sondern vor allem die Anzahl der c-erbB2 Homodimere erhöht und dadurch die Zellproliferation und -transformation verstärkt bzw. stimuliert (6). Der katalytisch inaktive c-erbB3 Rezeptor wird in verschiedenen Tumorarten überexprimiert (z. B. Brust und Magen, 108). Eine Überexpression von c-erbB4 konnte ebenfalls in einer Reihe von Tumoren wie z. B. die der Brust oder des Ovar gefunden werden (108), aber auch ein Verlust der Expression von c-erbB4 ist beschrieben (121,124).

Die Koexpression und damit die Möglichkeit zur Heterodimerisierung von Rezeptoren der erbB-Familie tragen maßgeblich zur Tumorentstehung bzw. -progression bei. In c-erbB2 überexprimierenden Tumoren findet man z. B. häufig den c-erbB3 Rezeptor koexprimiert (18). Im Heterodimer mit c-erbB3 bildet der c-erbB2 Rezeptor den am stärksten mitogen wirkenden Dimer unter allen Kombinationen der erbB-Rezeptoren (101) mit der größten stimulierenden Wirkung auf Proliferation, Transformation und Zellmobilität (15,143).

In zahlreichen Tumorentitäten finden sich jedoch auch der EGFR und/oder der c-erbB4 Rezeptor koexprimiert (93,136). Dabei wird deren durch körpereigene Wachstumsfaktoren stimulierte Signaltransduktion durch Heterodimerisierung mit c-erbB2 verstärkt und damit die Proliferation der Tumorzellen beschleunigt (109).

Eine Überexpression von EGFR oder c-erbB2 korrelieren je nach Tumorart mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, einer Resistenz gegenüber Chemo- und Hormontherapie, einer hohen Wahrscheinlichkeit der Bildung von Metastasen oder eines Rezidivs, einer schlechten Prognose und damit mit einem kürzeren krankheitsfreien und geringeren Gesamtüberleben der Patienten (68,114,150). Für die Koexpression von EGFR und c-erbB2 im Vergleich zur Expression eines dieser beiden Onkogene verstärkt sich der aggressive Phänotyp und/oder korreliert mit einer schlechteren Prognose in verschiedenen Tumoren wie

z. B. der Brust, des Plattenepithels, des Ovar und der Blase (93). Eine Koexpression von c-erbB3 wird trotz dessen nicht-autonomer Rolle (vgl. 1.1.1) als ein Parameter gesehen, der die Vorhersagekraft für eine Prognose festigt (146).

In der Literatur finden sich über c-erbB4 Angaben, die die Expression und Signalleitung dieses erbB-Rezeptors mit einer höheren Malignität eines Tumors in Verbindung bringen (42,74). In den letzten Jahren häufen sich jedoch Veröffentlichungen, die eine (Ko-)Expression von c-erbB4 mit einem längeren krankheitsfreien Überleben und einer guten Prognose korrelieren (14,123,134,146). Die Ursache für diese widersprüchlichen Aussagen wird darin gesehen, dass die Existenz der verschiedenen Isoformen des c-erbB4 (vgl. 1.1) und das Koexpressionsmuster der restlichen Mitglieder der erbB-Rezeptorfamilie die *in vivo* Funktion von c-erbB4 determinieren (44).

### 1.2.3 Bedeutung der erbB-Rezeptoren für die Tumorthherapie

In der Diagnostik ist vor allem die Überexpression des EGFR und des c-erbB2 von Bedeutung und bestimmend für die Therapieentscheidung bei den einzelnen Tumorentitäten. Dabei dienen der EGFR und der c-erbB2 Rezeptor selbst als Zielobjekte für eine spezifische Tumorthherapie. Diese kann die Funktion des Rezeptors auf verschiedenen Ebenen gezielt angreifen und die Signaltransduktion unterbinden. Die wichtigsten Methoden einer spezifischen Inhibition der Signalleitung durch erbB-Rezeptoren sind die Anwendung von

- erbB-Rezeptor-spezifischen monoklonalen Antikörpern zur Blockierung der Ligandenbindung oder der lateralen Rezeptor-Interaktion
- spezifischen TK-Inhibitoren (sog. *small molecules*)
- siRNA und *Antisense*-Technik zur Inhibition der Expression der *erbB*-Rezeptor-Gene und von
- Immunoliposomen, gekoppelten Antikörpern oder Liganden zum gezielten Transport von Toxinen, Wirkstoffen oder therapeutischen Genen (4,26,80,153).

Bis in die klinische Anwendung sind bislang die Antikörpertherapie und die Applikation von TK-Inhibitoren fortgeschritten. Bereits seit 1998 befindet sich der humanisierte monoklonale anti-c-erbB2 Antikörper Trastuzumab (Herceptin) zur Behandlung des c-erbB2 überexprimierenden, metastasierten Mammakarzinoms in der klinischen Anwendung (26), während sich weitere c-erbB2-spezifische Antikörper (z. B. Pertuzumab) in klinischen Studien befinden (53). Auch ein EGFR-spezifischer monoklonaler Antikörper konnte mit Cetuximab im Jahr 2003 in der Schweiz für die Kombinationstherapie zur Behandlung von metastasierendem Darmkrebs zugelassen werden (3). Unter den niedermolekularen, EGFR-

spezifischen TK-Inhibitoren wird Gefitinib (Iressa) für das schon chemotherapierte, nicht-kleinzellige Lungenkarzinom eingesetzt (54), während sich Erlotinib (Tarceva), ein weiterer TK-Inhibitor des EGFR, für die Kombinationstherapie in der klinischen Phase II zur Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms befindet (53).

In Kombination mit Chemotherapie konnten klinische Studien für die spezifischen erbB-Therapeutika einen additiven oder synergistischen Effekt zeigen (93). Die Ermittlung des Nutzens einer simultanen, spezifischen Blockierung von EGFR und c-erbB2 mit Antikörpern und/oder TK-Inhibitoren und auch der Einsatz von bispezifischen TK-Inhibitoren der erbB-Rezeptoren, wie z. B. Lapatinib, ist Gegenstand aktueller klinischer Studien und intensiver wissenschaftlicher Diskussion (vgl. 1.2.4 und Kapitel 8) (12,151).

#### *1.2.4 EGFR und c-erbB2 Expression im Mammakarzinom*

Im Mammakarzinom stehen insbesondere der EGFR und der c-erbB2 Rezeptor im Fokus des Interesses. In 25 - 30% der Patientinnen findet man eine Überexpression von c-erbB2 (114), die zu 97% durch eine *c-erbB2* Genamplifikation bedingt ist (99). Der EGFR wird in 14 - 91% der Mammakarzinome exprimiert (68,123,136) und eine Koexpression des EGFR bei positiver c-erbB2 Expression wurde für 38% der Fälle nachgewiesen (136).

Die Korrelation der EGFR- bzw. c-erbB2-Überexpression mit einem kürzeren Überleben von Patientinnen mit Mammakarzinom (68,114) und der Genamplifikation und Überexpression von c-erbB2 mit besonders aggressiven Adenokarzinomen der Mamma (109) und einer schlechten Prognose (85) hat beiden Rezeptoren in der Klinik eine große Bedeutung eingebracht. So wird in der Routinediagnostik des Mammakarzinoms der c-erbB2 Status bestimmt, um Patientenkollektive für die Therapie mit Herceptin zu identifizieren. Dieser Antikörper bindet an die extrazelluläre Domäne des c-erbB2 Rezeptors (16) und zeigt im Einsatz gegen das c-erbB2 überexprimierende Mammakarzinom einen Anti-Tumor Effekt (20,141), der über mehrere Mechanismen vermittelt wird. So wirkt Herceptin inhibierend auf die Zellproliferation (117), bestätigt in dieser Arbeit, die Angiogenese, das c-erbB2 *Shedding* (proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne), vermittelt die Rezeptor-*Downregulation* durch Endozytose und löst *in vivo* eine Immunantwort in Form einer Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität aus (1).

Um in der Diagnostik diejenigen Patienten zu ermitteln, die auf eine Herceptin-Therapie mit hoher Wahrscheinlichkeit ansprechen, werden bislang zwei Methoden verwendet, die den c-erbB2 Status bestimmen: Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) detektiert eine Genamplifikation, die Immunhistochemie (IHC) eine Proteinüberexpression. Dabei sind die Richtlinien, nach denen eine Genamplifikation bzw. eine Rezeptorüberexpression definiert



wird, exakt festgelegt. Die Literatur beschreibt die FISH-Analyse als den „Gold-Standard“, durch dessen Klassifikation einer c-erbB2 Amplifikation die im Vergleich zur IHC bessere Korrelation zum Ansprechen auf eine Herceptin-Therapie erreicht wird (85,98). Beide Methoden sind durch die FDA (*US Food and Drug Administration*) als Test zugelassenen, um Patienten für eine Herceptin-Therapie zu selektionieren. Jedoch wird in der Diagnostik der Nachweis des c-erbB2 Expressionslevels routinemäßig immunhistochemisch durchgeführt, da diese Methode einfacher und schneller anzuwenden und mit geringeren Kosten verbunden ist (46).

Auf eine Herceptin-Therapie reagieren trotz eines in der IHC ermittelten, maximalen c-erbB2-Überexpressionslevels nur 18-41% der Tumoren in einer Monotherapie (1) bzw. 50% bei adjuvanter Applikation (115). Dies impliziert, dass nicht die c-erbB2-Überexpression alleine, sondern weitere Faktoren eine Rolle dabei spielen müssen, ob ein Tumor sensitiv für Herceptin ist (7,123,136). Da ein Zusammenwirken der erbB-Rezeptoren in Form von lateraler Interaktion essentiell für die Weiterleitung von Liganden-vermittelten Signalen ist, wird die Koexpression der übrigen erbB-Rezeptoren als ein die Therapie bestimmender Parameter vorgeschlagen (1). Dies wird durch eine kürzlich veröffentlichte retrospektive Studie einer Analyse von Gewebeschnitten von Mammakarzinom-Patientinnen unterstützt, die eine Korrelation der Expression von erbB-Rezeptoren, erbB-Liganden und der Aktivierung von nachgeschalteten Signaltransduktions-Wegen mit der Responsrate bei einer Herceptin-Therapie fanden (118). Aktuelle Studien liefern erste Anhaltspunkte dafür, dass im Mammakarzinom eine Koexpression von EGFR und c-erbB2 einen synergistisch negativen Effekt auf das krankheitsfreie Überleben hat, eine schlechtere Prognose mit sich bringt und mit einem weiter erhöhten Risiko, ein Rezidiv zu entwickeln, eingeht (123,136). Darüber hinaus konnte in einer multivarianten Analyse die Kombination von EGFR und c-erbB2 als unabhängiger prognostischer Parameter für das krankheitsfreie und das Gesamtüberleben herausgestellt werden (136). Dennoch wird in der klinischen Routinediagnostik des Mammakarzinoms bislang ausschließlich der c-erbB2 Status bestimmt. Eine Koexpression des EGFR oder anderer erbB-Rezeptoren wird bislang nicht berücksichtigt.

### 1.3 ZIELSETZUNG

Die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen der erbB-Familie spielen in der Tumorgenese und der Ausprägung malignen Zellwachstums eine bedeutende Rolle. Der Nachweis einer Überexpression des EGFR, vor allem aber des c-erbB2 hat heute einen großen diagnostischen Stellenwert, trägt zur Prognosebestimmung bei und hat entscheidende therapeutische Konsequenzen. Eine Reihe von Studien zeigt jedoch, dass malignes Wachstum und therapeutische Erfolge auf der Basis der Überexpression nur eines Rezeptors, wie des c-erbB2 im Mammakarzinom, nicht sicher vorhergesagt werden können. Als eine mögliche Ursache hierfür wird die Koexpression der erbB-Rezeptoren vorgeschlagen, die ausschließlich durch gegenseitige Wechselwirkung intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren und somit in Kooperation die Reaktion bzw. die Antwort einer Zelle auf extrazelluläre Liganden bestimmen. In der Literatur gibt es erste Daten zur Korrelationen des Rezeptor-Koexpressionsstatus und der Prognose, jedoch sind die Mechanismen und die Zusammenhänge von Rezeptor-Interaktion, -Aktivierung und dem proliferativen Respons einer Zelle in Abhängigkeit eines differenziellen Koexpressionsprofil nur in Ansätzen verstanden.

Die Kernaspekte der hier vorgestellten Arbeit sind Untersuchungen zur

1. Koexpressions- und Liganden- (Wachstumsfaktor- und anti-erbB-Rezeptor Antikörper-) abhängigen Interaktion von erbB-Rezeptoren,
2. Koexpressions- und Liganden-abhängigen Aktivierung der erbB-Rezeptoren durch Phosphorylierung,
3. sowie dynamische Analysen zur Liganden-getriggerten und erbB-Rezeptor-vermittelten Regulation von Tumorzellproliferation.

Ziel dieser Promotionsarbeit ist es, die Beziehung zwischen der Regulation von Proliferation, der Aktivierung von erbB-Rezeptoren durch Phosphorylierung und deren Interaktion in Abhängigkeit spezifischer erbB-Koexpression an *in vitro* Zellkulturen zu erfassen. Eine besondere Berücksichtigung soll dabei der beim Mammakarzinom besonders relevante c-erbB2-Rezeptor Status finden und die Rolle einer differenziellen EGFR-Koexpression untersucht werden. Dazu wurden gezielt die beiden Mammakarzinom-Zelllinien BT474 und SK-BR-3 ausgewählt, da sich SK-BR-3 Zellen im Vergleich zu BT474 bei einem ähnlichen c-erbB2-Überexpressionslevel durch einen dreifachen Gehalt an EGFR auszeichnen.

1. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde mittels dynamischer Proliferationsuntersuchungen durchflusszytometrisch die Bedeutung von gegebener Koexpression für die Regulation des Zellzyklus ermittelt. Dazu wurde der Einfluss von BrdU auf die Zellproliferation

untersucht, um für die Analyse der Proliferationskinetik bei den beiden Mammakarzinom-Zelllinien BT474 und SK-BR-3 die Anwendbarkeit einer BrdU-Markierung zu bestimmen. Mit der anti-BrdU Technik wurden im Anschluss die Effekte von Wachstumsfaktoren und Herceptin für das Proliferationsverhalten von BT474 und SK-BR-3 Zellen untersucht. Außerdem wurde mit der BrdU/Hoechst-Quenching Technik der auf die Zellproliferation inhibierend wirkende Effekt von Herceptin für beide Mammakarzinom-Zelllinien durch Quantifizierung der G0-Phase-Fraktion bestimmt.

2. Um Aufschluss über die initiale Weiterleitung der Signale in die Zelle hinein zu erhalten, wurden im zweiten Abschnitt die Rezeptoren EGFR und c-erbB2 proteinchemisch untersucht, um die Liganden-induzierte, Phosphotyrosin-spezifische Aktivierung zu evaluieren.
3. Im dritten Schritt wurden die Liganden-abhängige EGFR und c-erbB2 Homo- und EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung mit der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) Technik durchflusszytometrisch untersucht und Unterschiede in Abhängigkeit der erbB-Koexpression ermittelt.

Ein erweitertes Verständnis der Zusammenhänge der initialen Ereignisse auf der Ebene der lateralen erbB-Signaltransduktion, der Rezeptor-Aktivierung und der Konsequenzen für die Zelle in Bezug auf eine gesteigerte oder verlangsamte Proliferation soll dazu beitragen,

- die Wertigkeit der Koexpression der Rezeptoren der erbB-Familie für das c-erbB2 überexprimierende Mammakarzinom genauer zu definieren,
- die prognostische Aussagekraft von erbB-Rezeptor Expressionsprofilen zu präzisieren,
- langfristig die Patientenstratifizierung zu verbessern und
- die Basis für die Entwicklung und Anwendung von zielgerichteten erbB-Therapeutika, die gegen die Rezeptoren, deren Aktivierung oder gegen deren Wechselwirkung gerichtet sind, zu bieten.

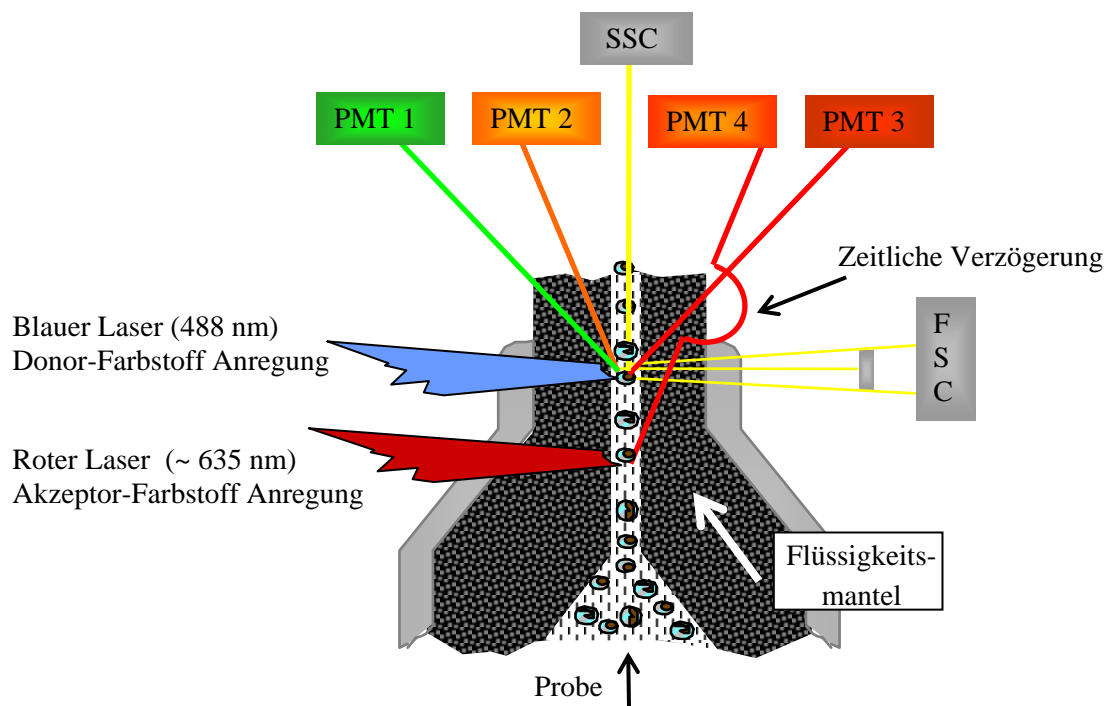
## 2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

### 2.1 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE FLUORESZENZANALYTIK

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse von physikalischen, biologischen, chemischen und physiologischen Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Die Hauptanwendung dieser Technik liegt darin, mit Fluoreszenzfarbstoffen bekannter Charakteristika bzw. Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern biologische Zellen hinsichtlich biophysikalischer Eigenschaften wie DNA-Gehalt, Antigenexpression, etc. von Zellen und Zellpopulationen zu phänotypisieren (142).

Die Durchflusszytometer FACSCalibur und FACStar<sup>PLUS</sup> (FACS: *Fluorescence-Activated Cell Scanning*, BD Biosciences, Heidelberg) bestehen aus drei bzw. vier Komponenten: einem Flüssigkeitssystem, einem optischen System, einer Detektionseinheit mit angeschlossener Elektronik und Datenverarbeitung und im Fall des Geräts FACStar<sup>PLUS</sup> einer Sortiereinrichtung.

Das Flüssigkeitssystem in beiden Geräten hat die Aufgabe, Zellen einer Einzelzellsuspension wie an einer Perlenkette einzeln und nacheinander an einem gebündelten Laserstrahl einer bestimmten Wellenlänge vorbeizuleiten (Abb. 3). Die sog. "hydrodynamische Fokussierung" verhindert dabei durch laminare Strömungseigenschaften eine Durchmischung von Probenlösung und Trägerflüssigkeit.



**Abb. 3:** Hydrodynamische Fokussierung und sequentielle Zwei-Laser-Anregung von an Zellen gebundenem Farbstoff an der Durchflussküvette des Durchflusszytometers FACSCalibur. PMT: Photomultiplier, SSC: Seitwärtsstreulicht, FSC: Vorwärtsstreulicht.

Zusätzlich zur Fluoreszenz werden das Vorwärtstreulicht (*forward scatter light*, FSC) in einem Winkel zwischen  $1,5^\circ$  und  $10^\circ$  zur Strahlenrichtung des Anregungslasers und das Seitwärtstreulicht (*sideward scatter light*, SSC) im  $90^\circ$ -Winkel abgegriffen, was Informationen über die Größe bzw. die Granularität einer Zelle liefert. Für das SSC erfolgt die Umwandlung des optischen in ein digitales Signal wie für die Fluoreszenzen durch einen Photodetektor. Das FSC wird durch eine Photodiode digitalisiert und an den Computer weitergeleitet.

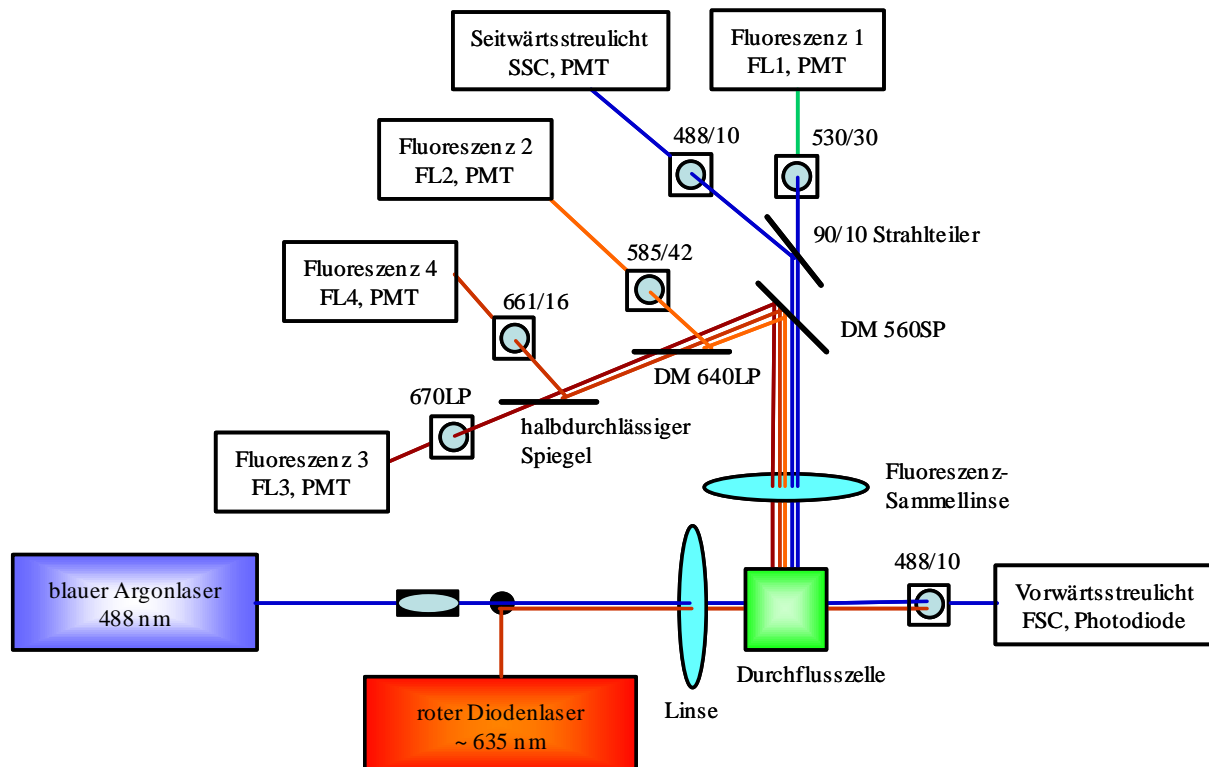


Abb. 4: Schematische Darstellung des optischen Systems des Durchflusszytometers FACSCalibur. LP: Langpassfilter, SP: Kurzpassfilter, PMT: Photomultiplier, DM: dichroitischer Spiegel. Für die Bandpassfilter ist die maximale Transmission und die Hälfte der Bandbreite angegeben. In Anlehnung an (35), verändert.

### 2.1.1 Das Durchflusszytometer FACSCalibur

Die Laseranregung im FACSCalibur erfolgt durch einen luftgekühlten Argon-Ionenlaser (488 nm, Leistung 15 mW) und einen roten Diodenlaser ( $\sim 635$  nm) (Abb. 3 und Abb. 4). Der erste und der zweite Laser werden dabei auf verschiedenen Ebenen entlang des Flüssigkeitsstroms fokussiert und die zugehörigen Fluoreszenzemissionen der Probe räumlich und zeitlich getrennt voneinander detektiert. Durch eine verzögerte Weiterleitung des Signals, das durch den roten Lasers generiert wird, relativ zu dem des blauen Lasers wird diese zeitliche Differenz ausgeglichen und beide Signale werden ein und derselben Zelle zugeordnet (35).

Mit diesem System ist es möglich, bis zu vier Fluoreszenzen (FL1-FL4) gleichzeitig zu messen. Dabei wird ausgenutzt, dass sich unterschiedliche Farbstoffe bei exakt der gleichen Wellenlänge (z. B. 488 nm) anregen lassen, jedoch ein für den Farbstoff charakteristisches Emissionsmaximum besitzen und sich somit bei unterschiedlichen Wellenlängen (FL1-3, vgl. Tab. 2) detektieren lassen. Die Auswahl an verwendbaren Farbstoffen wird beim FACSCalibur durch die Zweilaser-Anregung auf Farbstoffe mit Absorptionsmaxima im Bereich des roten Lasers (~ 635 nm) und einer Emission bei ca. 661 nm (FL4) erweitert.

### 2.1.2 Das Durchflusszytometer FACStar<sup>PLUS</sup>

Im Vergleich zum FACSCalibur besitzt das Durchflusszytometer FACStar<sup>PLUS</sup> anstatt des roten Diodenlasers einen wassergekühlten Argon-Ionenlaser mit Emissionslinien von 351 nm bis 363 nm (36). Diese Anregung im UV-Bereich wurde mit einer Laserleistung von 100 mW für die Messung des Farbstoffs Hoechst33258 (Hoe) verwendet, der bei 345 nm sein Absorptionsmaximum aufweist (Tab. 2) (131).

### 2.1.3 Farbstoffe

Die verwendeten Farbstoffe sind mit deren Absorptions- bzw. Emissionsmaxima, den Anregungswellenlängen und dem für die Messung des Farbstoffs verwendeten Durchflusszytometer mit dem entsprechenden Detektionskanal und dem zugehörigen Interferenzfilter in Tab. 2 aufgeführt.

Farbstoff	Absorptions- maximum [nm] (131)	Emissions- maximum [nm] (131)	Anregungs- wellenlänge [nm]	Durchfluss- zytometer	Detektions- kanal	Interferenz- filter
FITC	495	519	488	FACSCalibur	FL1	530/30
Cy3	512; 552	565; 615	488	FACSCalibur	FL2	585/42
PE	480; 565	578	488	FACSCalibur	FL2	585/42
PI	536	617	488	FACSCalibur FACStar <sup>PLUS</sup>	FL3	670LP
Cy5	625-650	670	~ 635	FACSCalibur	FL4	661/16
Hoe	345	478	351 - 363	FACStar <sup>PLUS</sup>	FL4	425/40

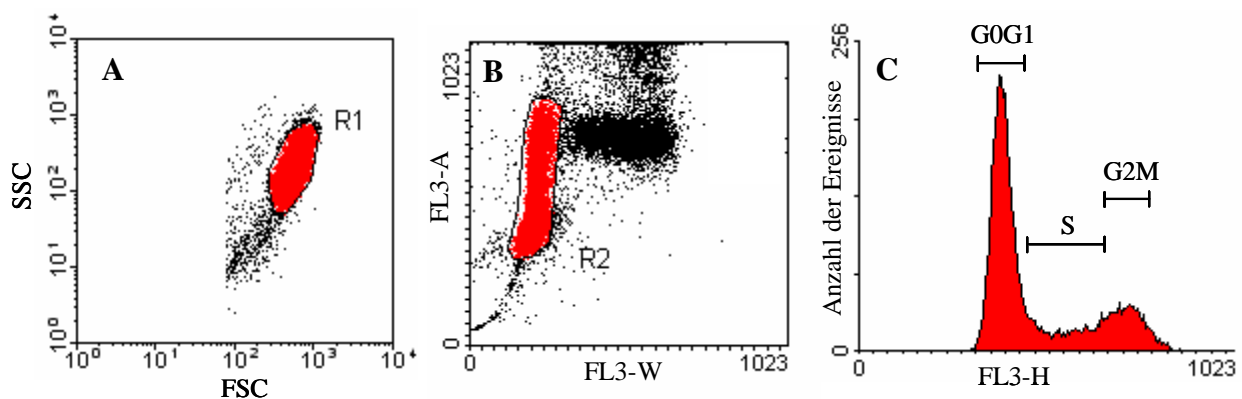
**Tab. 2:** Angegeben sind die verwendeten Fluorochrome, deren Absorptions- und Emissionsmaxima (131), die Anregungswellenlängen, das für die Messung des Farbstoffs verwendete Durchflusszytometer, der entsprechende Detektionskanal und technische Daten der Interferenzfilter. Eine Zahlenangabe der Form wie z. B. 530/30 beschreibt einen Bandpassfilter, der Wellenlängen von  $530 \pm 15$  nm passieren lässt. Die Angabe 670LP steht für einen Langpassfilter (LP), der für Licht des Wellenlängenbereichs ab 670 nm durchlässig ist. FL: Fluoreszenz, FITC: Fluorescein-Isothiocyanat, Cy3: Cyanin 3, PE: R-Phycoerythrin, PI: Propidiumiodid, Cy5: Cyanin 5, Hoe: Hoechst33258.

### 2.1.4 Standardsoftware

Alle durchflusszytometrischen Messungen erfolgten mit der Software CELLQuest (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) an einem Macintosh G3 Computer. Die Rohdaten zu jedem gemessenen Ereignis wurden als *list-mode* Datenfile FCS 2.0 (*Flow Cytometry Standard 2.0*) gespeichert und zur Weiterbearbeitung auf einen Standard-PC übertragen. Die Daten zur Zellzyklusverteilung wurden mit der Software Expo32 v1.2 und WinCycle32 Version 11.05.02 Beta (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA) ausgewertet, die zweiparametrischen DNA-Messungen mit dem Programm WinMDI 2.8 (J. Trotter, <http://facs.scripps.edu/>). Densitometrische Quantifizierungen erfolgten mit dem Programm *Image Quant V5.2* aus dem Programmpaket *IQ Solutions V1.31* von Amersham (vgl. 4.2.4).

### 2.1.5 Datendarstellung und Datenverarbeitung

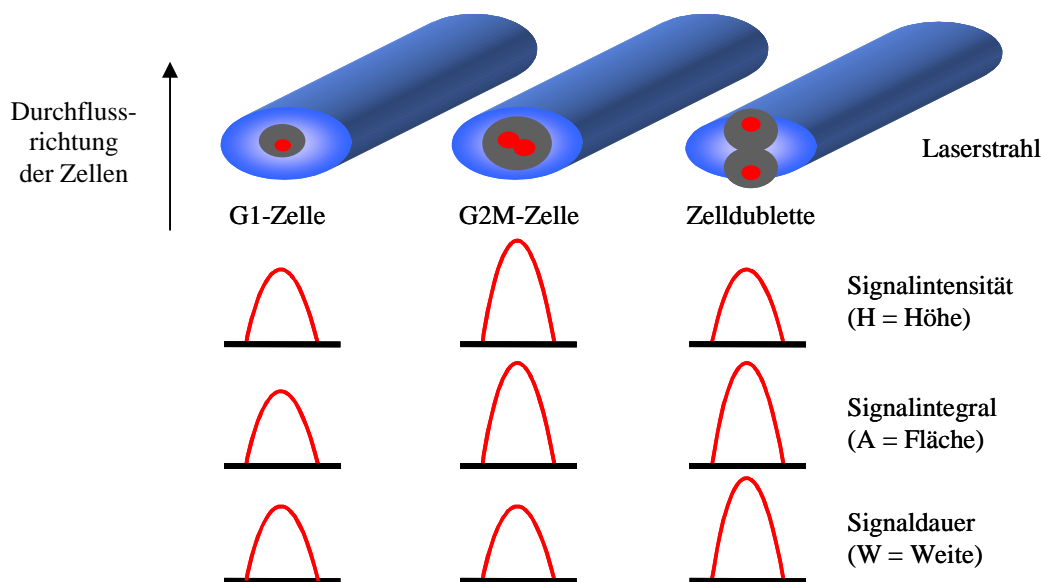
Zur graphischen Darstellung von zwei gemessenen Parametern wurden in einem zweidimensionalen *Dot*- oder *Density*-Plot das SSC-Signal bzw. die Fluoreszenz eines Farbstoffs auf der Ordinate gegen das FSC-Signal oder die Fluoreszenz des zweiten Farbstoffs auf der Abszisse aufgetragen. Mit dieser Darstellung lassen sich bestimmte Zellpopulationen wie z. B. intakte, vitale Zellen (Abb. 5 A) oder Farbstoff-gefärbte Zellen identifizieren. Zelltrümmer und Farbstoffaggregate (Debris) können anhand des schwächeren FSC- und SSC-Signals erkannt werden. Zellaggregate, sog. „Zelldubletten“, sind größer und granulärer als Einzelzellen und werden dadurch anhand von stärkeren FSC- und SSC-Signalen ausgemacht. Mit Hilfe einer Region (Abb. 5 A: R1), die sich um eine gewünschte Population an Zellen zeichnen lässt, können diese markiert und ausgewählt werden.



**Abb. 5: Gating und Dublettendiskriminierung.** A: Gating in einem FSC/SSC-*Dot*-Plot: Die gewünschte Population vitaler Zellen wird durch eine Region (R1) markiert. B: Die in A mit R1 ausgewählten Zellen sind in einer Auftragung der Signal-Fläche (FL3-A) gegen die Signal-Weite (FL3-W) abgebildet. Die Dubletten werden durch Region 2 (R2) ausgeschlossen. C: Der DNA-Gehalt der in A und B ausgewählten Zellen wird in einem Histogramm dargestellt. Zu den Bezeichnungen G0G1, S und G2M: vgl. Kapitel 2.2.1.

Die Definition dieser Region als "Gate" erlaubt die graphische Darstellungen der ausgewählten Population in weiteren *Dot-/Density*-Plots oder Histogrammen (Abb. 5 B und C). Dadurch können z. B. nach *Gating* im FSC/SSC-Plot zusätzliche Eigenschaften von Zellen untersucht werden, deren DNA oder von denen bestimmte Antigene mit Antikörpergekoppelten Farbstoffen gefärbt wurden.

Für die Auftragung eines einzelnen Parameters wie z. B. des DNA-Gehalts (Abb. 5 C) oder einer Antigenfärbung wird ein Histogramm verwendet. Dazu wird die Anzahl der Ereignisse auf der y-Achse gegen die Fluoreszenzintensität der Färbung auf der x-Achse aufgetragen. Die Zellzyklusverteilung einer einparametrischen DNA-Färbung wurde mit dem Programm WinCycle32 mit einer S-Phasen Bestimmung nullter Ordnung berechnet. Diese Methode ermittelt die Peaks der Zellzyklusphasen G0/G1 bzw. G2M (vgl. 2.2.1) symmetrisch und "Gauss-verteilt" und ordnet unter der Annahme von geringen Überlappungen den dazwischen liegenden Bereich der S-Phase Fraktion (SPF) zu (105). Um Zelldubletten von einer Messung auszuschließen, wurden bei der einparametrischen DNA-Messung die Pulsprozessoren verwendet. Diese erlauben es, nicht nur die Signal-Intensität (Höhe H), sondern auch die Dauer eines Signals (Weite W) und das Integral des Peaks (Fläche A) zu messen (Abb. 6).



**Abb. 6:** Pulsprozessoren erlauben die Registrierung von Signalintensität (Höhe H), -integral (Fläche A) und -dauer (Weite W). Da Zelldubletten im Vergleich zu Einzelzellen mehr Zeit benötigen, um den Laserstrahl zu durchqueren, geben diese in Bezug auf die Signaldauer ein höheres Signal als Einzelzellen, was deren Unterscheidung ermöglicht. In Anlehnung an (10), verändert.

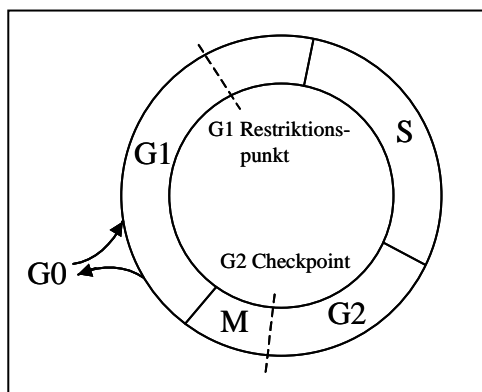


Da Dubletten aufgrund ihrer Größe die Dimensionen des Laserstrahls übersteigen und im Vergleich zu einer Einzelzelle mehr Zeit benötigen, durch den Laserstrahl zu treten, liefern diese ein größeres Weitensignal als Einzelzellen mit identischer Fluoreszenz-Markierung. Durch eine adäquat gesetzte Region in einer Auftragung von Signal-Weite gegen Signal-Fläche (Abb. 5 B) können in eine anschließende Darstellung des DNA-Gehalts (Abb. 5 C) ausschließlich die Einzelzellen einfließen.

## 2.2 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ZELLZYKLUSANALYSE

### 2.2.1 Der Zellzyklus

Von Howard und Pelc (52) wurde die bis heute gültige Unterteilung des Zellzyklus in die Phasen G1, S, G2 und M eingeführt (Abb. 7). In der lichtmikroskopisch beobachtbaren Mitose (M-Phase) teilt sich die Zelle in zwei identische Tochterzellen. Die dafür notwendige Verdoppelung der genetischen Information der DNA findet in der Synthese-Phase (S-Phase) statt. Zwischen M- und S-Phase dienen die sog. G1-Phase (*gap-1*) vor der Synthesephase bzw. die G2-Phase (*gap-2*) vor der Mitose zur Vorbereitung auf die nachfolgende Zellzyklusphase (60).



**Abb. 7: Die Phasen eines Zellzyklus G1, S, G2, M und die Ruhephase G0. Der Restriktionspunkt in der G1-Phase und der G2 Checkpoint sind zwei Regulationspunkte des Zellzyklus.**

Für die Bildung und die Aufrechterhaltung von komplexen Geweben und Organismen ist es notwendig, dass das Zellwachstum und somit der Zellzyklus einer Regulation und Kontrolle unterliegt (34). Ein Kontrollpunkt im Zellzyklus befindet sich mit dem sog. Restriktionspunkt in der G1-Phase. Beim Überschreiten dieses Abschnitts im Zellzyklus geht die Zelle von einem Wachstumsfaktor-abhängigen in einen weitgehend Wachstumsfaktor-unabhängigen Abschnitt der G1-Phase über. Bei Anwesenheit von mitogenen Signalen (Wachstumsfaktoren) wird eine Zelle den Restriktionspunkt überschreiten und weiterhin am Zellzyklus teilnehmen. Beim Fehlen der notwendigen Stimuli oder bei anti-mitogenen

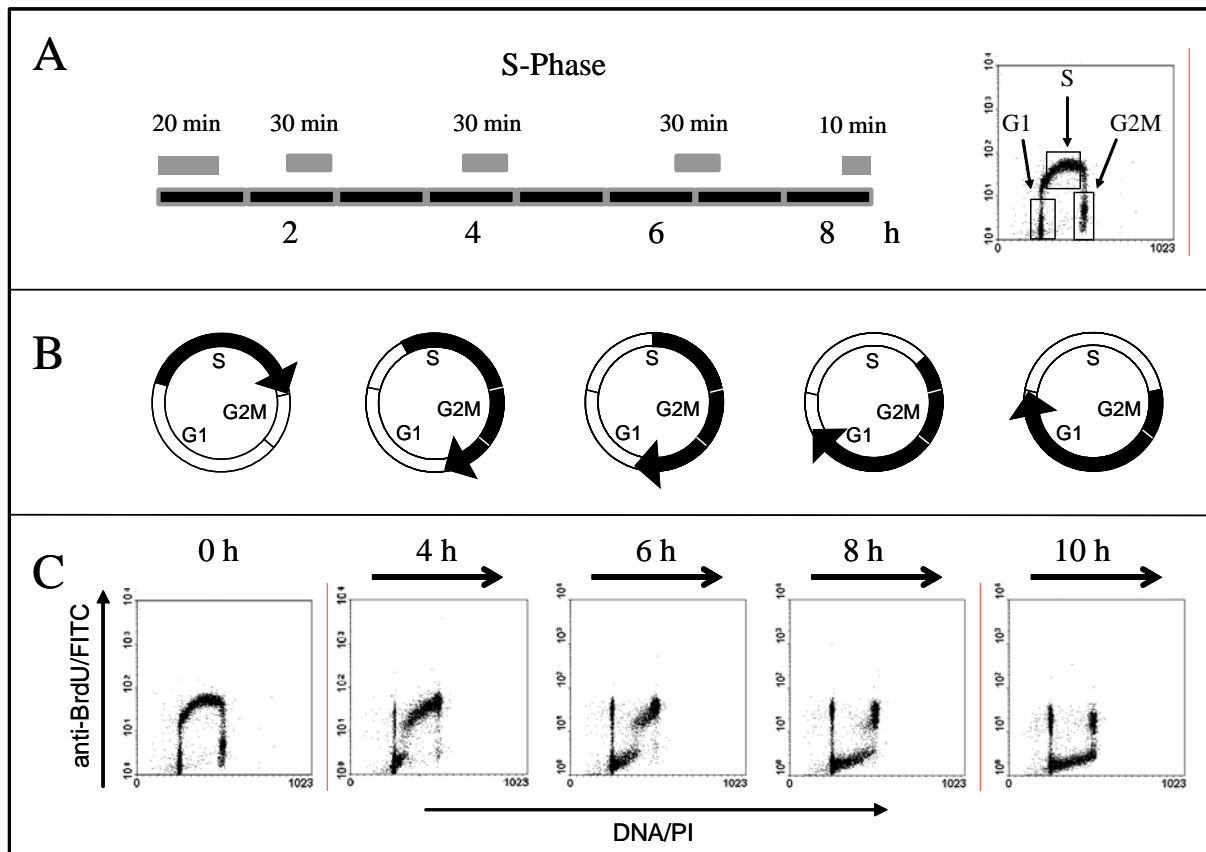
Signalen (z. B. TGF $\beta$ ) kann eine Zelle in die Ruhephase G0 eintreten (60). Diese Fraktion von Zellen nimmt nicht mehr aktiv am Zellzyklus teil und weist einen geringeren Energie- und Stoffumsatz auf (67,97). Durch die Stimulation mit sog. Kompetenzfaktoren können Zellen aus der G0-Phase zurück in die G1-Phase und somit wieder in den Zellzyklus gebracht werden (10,77). Zellen können ihre Teilungsfähigkeit jedoch nicht nur durch den Übertritt in die Ruhephase verlieren, sondern diese auch durch Differenzierung einbüßen. Bei differenzierten Zellen ist es oft nicht mehr möglich, sie in den aktiven Zellzyklus zurückzuführen (60).

Ein weiterer Kontrollpunkt liegt am Ende der G2-Phase, an dem ein erfolgreicher Abschluss der DNA-Replikation überprüft wird, was eine Voraussetzung für den Übertritt der Zellen in die Mitose darstellt (60). Die M-Phase vollzieht sich im Allgemeinen innerhalb von wenigen Minuten. Deshalb wird diese Zellzyklusphase meist mit der G2-Phase, deren Dauer typischerweise bei 6 bis 8 Stunden liegt, zusammengefasst und als G2M-Phase beschrieben (vgl. Abb. 8 und Abb. 9). Ebenfalls in diesem zeitlichen Bereich liegt die S-Phase, die ca. 6 bis 8 Stunden umfasst (77). Die Länge der G1-Phase kann je nach Zelltyp stark variieren. So weisen normale, nicht transfizierte Zelllinien eine G1-Phasenlänge von 9 bis 40 Stunden auf, für Tumorzelllinien wird hierfür ein Bereich von 10 bis 26 Stunden angegeben (32). Nach Daten aus *in vitro* Kulturen beruht eine Modifikation der Dauer des Zellzyklus in den meisten Fällen auf einer veränderten Länge der G1-Phase (102,119,152). Durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren oder anti-mitogenen Faktoren zu *in vitro* Zellkulturen kann deren Einfluss auf die Verlängerung bzw. Verkürzung der G1-Phase durch die Messung der Dauer des Zellzyklus, insbesondere der G1-Phase, ermittelt werden (11). Analog kann der Effekt von stimulierenden und anti-mitogenen Faktoren auf den Anteil der Zellen, die in die G0-Phase ein- oder aus ihr austreten, bestimmt werden (vgl. 2.2.3).

### 2.2.2 Die anti-BrdU Technik

Die 1983 von Dolbeare *et al.* vorgestellte anti-BrdU Technik ermöglicht die Analyse der Zellzykluskinetik mit Hilfe der Durchflusszytometrie (28). Hierbei werden Zellen für 30 min dem halogenierten Pyrimidin 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) ausgesetzt, das bei Zellen, die sich in der Replikation befinden, als Basenanalagon an Stelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird (22). Die Inkorporation von BrdU wird durch eine Färbung mit einem monoklonalen anti-BrdU Antikörper nachgewiesen, der entweder direkt mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) konjugiert sein kann, oder mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper kombiniert wird. Zellen, die während des BrdU-Pulses in die S-Phase ein-

oder aus dieser austreten, können weniger BrdU einbauen und weisen somit ein geringeres Signal in Bezug auf die FITC-Fluoreszenzintensität auf (Abb. 8 A) (10).



**Abb. 8: Die anti-BrdU Technik.** A: Zellen werden einer 30-minütigen Pulsmarkierung mit BrdU unterzogen, das von Zellen in der S-Phase als Thymidinanalogon in die DNA eingebaut wird. Zellen, die während des BrdU-Pulses in die S-Phase eintreten oder diese verlassen, zeigen aufgrund des kürzeren, für den BrdU-Einbau zur Verfügung stehenden Zeitintervalls einen geringeren Gehalt an BrdU. B: Nach der Pulsmarkierung schreiten die Zellen im Zellzyklus fort. C: Zweidimensionale *Dot*-Plots einer BrdU-Färbung mit FITC-markierten Sekundärantikörpern in Kombination mit anti-BrdU Antikörpern (y-Achse) gegen eine DNA-Färbung mit PI (x-Achse) von Zellen, die zu unterschiedlichen Zeiten nach dem BrdU-Puls geerntet wurden. In Anlehnung an (10), verändert.

Werden Proben zu unterschiedlichen Zeiten nach dem BrdU-Puls geerntet, schreiten die Zellen im Zeitintervall zwischen BrdU-Puls und Ernte im Zellzyklus fort (Abb. 8 B) (22). BrdU-positive Zellen gelangen somit aus der S-Phase über die G2M-Phase in die G1-Phase des zweiten Zellzyklus usw. Die Position der BrdU-positiven und -negativen Zellen im Zellzyklus zur Zeit der Entnahme der Probe wird durch eine Färbung mit Propidiumiodid (PI) bestimmt, das stöchiometrisch in die DNA interkaliert und damit den Gesamt-DNA-Gehalt jeder einzelnen Zelle widerspiegelt. In einer zweidimensionalen Auftragung der Fluoreszenzintensität von FITC (logarithmische y-Achse) und PI (lineare x-Achse) in einem *Dot*-Plot ist es möglich, die Population der BrdU-positiven Zellen von den BrdU-negativen

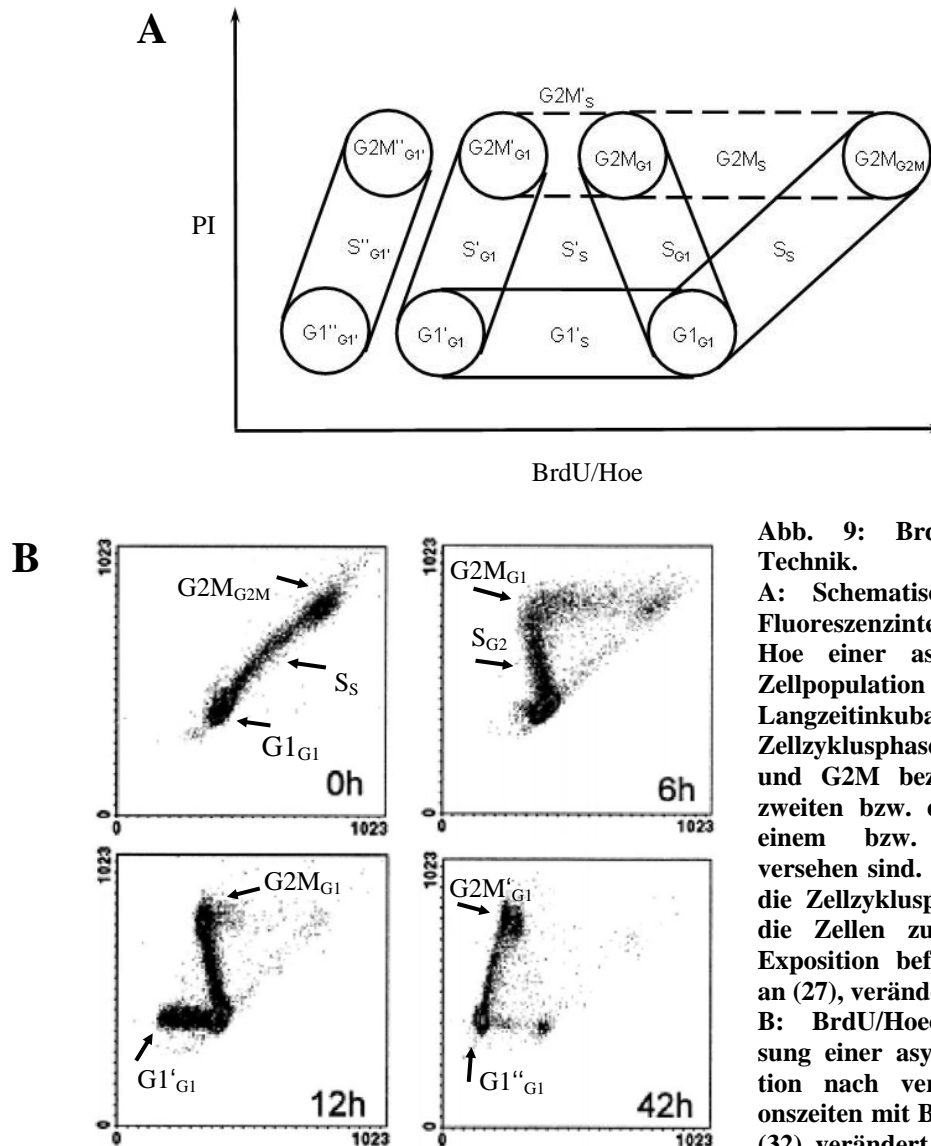
Zellen zu unterscheiden und die Zellzyklusphase, in der sie sich befinden, zu identifizieren (Abb. 8 C) (29).

Diese selektive Markierung von S-Phase Zellen definiert ein zeitliches Fenster im Zellzyklus, dessen Fortschreiten durch die unterschiedlichen Zellzyklusphasen verfolgt werden kann (145). Es lassen sich dadurch die Effekte von Wachstumsfaktoren oder Inhibitoren auf die Geschwindigkeit des Durchschreitens der Zellzyklusphasen im Vergleich zu unstimulierten Zellen untersuchen. Um die Zellzykluskinetik unterschiedlich behandelte Parallelansätze zu vergleichen (vgl. 5.1.3), wurde der Übergang  $G1 \rightarrow S$ -Phase im zweiten Zellzyklus nach der Pulsmarkierung mit BrdU als Orientierung verwendet und zu einem bestimmten Zeitpunkt nach dem BrdU-Puls der Anteil der in die S-Phase fortgeschrittenen Zellen bestimmt und verglichen.

### 2.2.3 Die BrdU/Hoechst-Quenching Technik

Die BrdU/Hoechst-Quenching Technik stellt neben der anti-BrdU Technik (vgl. 2.2.2) eine weitere Methode dar, um Zellzykluskinetiken von Zellpopulationen zu untersuchen. Im Gegensatz zur anti-BrdU Technik werden bei der BrdU/Hoechst-Quenching Technik die Zellen nicht kurzzeitig sondern kontinuierlich dem Nucleotidanalogen BrdU ausgesetzt, das wiederum während der S-Phase an Stelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird. Eine Zellzyklusanalyse mit Hilfe der BrdU/Hoechst-Quenching Technik beruht auf der Verwendung der DNA-Farbstoffe Hoe und PI, wobei Hoe an AT-Basenpaare bindet (75,76) und eine verminderte Fluoreszenzintensität zeigt, wenn BrdU in die DNA eingebaut ist (*Quenching*) (69,70,71). Demgegenüber ist die Fluoreszenzintensität von PI, dem DNA-interkalierenden Farbstoff, unabhängig von der Substitution des Thymidin durch BrdU. Eine zweidimensionale Auftragung der Fluoreszenz von PI (y-Achse) gegen Hoe (x-Achse) ermöglicht die Unterscheidung von asynchron wachsenden Zellen in bis zu drei aufeinander folgenden Zellzyklen und deren Position in Bezug auf  $G_0$ ,  $G_1$ -, S- oder  $G_2M$ -Phase (96).

Abb. 9 macht den *Quenching*-Effekt der durch UV-Licht angeregten Hoe-Fluoreszenz deutlich. Anfänglich, d. h. ohne BrdU-Zugabe zu den Zellen, kann eine normale Zellzyklusverteilung ( $G_{1G_1}$ ,  $S_S$  bzw.  $G_{2M_{G_2M}}$ ) sowohl für die blaue (Hoe) als auch für die rote Fluoreszenz (PI) beobachtet werden (Abb. 9 A und B, 0 h). Bei einem Fortschreiten der Zellen im ersten Zellzyklus nach BrdU-Zugabe und einer steigenden BrdU-Substitution nimmt auch der *Quenching*-Effekt von BrdU auf Hoe zu und vermindert die Fluoreszenzintensität dieses Farbstoffs (Abb. 9 A und B, 6 h), d. h. die Spur des ersten Zellzyklus geht nach links von ihrem Ausgangspunkt weiter zu geringeren Hoe-Intensitäten.



**Abb. 9: BrdU/Hoechst-Quenching Technik.**

**A:** Schematische Darstellung der Fluoreszenzintensität von PI gegen Hoe einer asynchron wachsenden Zellpopulation nach BrdU-Langzeitinkubation. Die einzelnen Zellzyklusphasen sind mit G0, G1, S und G2M bezeichnet, die für den zweiten bzw. dritten Zellzyklus mit einem bzw. zwei Apostrophen versehen sind. Die Indizes weisen auf die Zellzyklusphase hin, in der sich die Zellen zu Beginn der BrdU-Exposition befanden. In Anlehnung an (27), verändert.

**B:** BrdU/Hoechst-Quenching Messung einer asynchronen J82-Population nach verschiedenen Inkubationszeiten mit BrdU. In Anlehnung an (32), verändert.

Zugleich ergibt sich ein Anstieg der bei 488 nm angeregten PI-Fluoreszenz aufgrund der Zunahme des DNA-Gehalts beim Fortschreiten der Zellen im Zellzyklus (96). Durch die Zellteilung am Ende des ersten Zellzyklus halbiert sich der DNA-Gehalt der Zellen und damit auch die PI- und Hoe-Fluoreszenzintensität (vgl.  $G1'_{G1}$  und  $G1'_S$  in Abb. 9 A und B, 12 h). Da die Zunahme der BrdU-Substitution im zweiten Zellzyklus nicht mehr das Ausmaß des ersten Zellzyklus erreicht, sondern - mit einem prozentualen Anstieg der Substitution von 50% auf 75% - nur mehr 25% beträgt, fällt der *Quenching*-Effekt im zweiten Zellzyklus geringer aus (61,63). Es findet sich somit ein leichter Anstieg der Hoe-Fluoreszenz im zweiten Zellzyklus und auch in weiteren Zellzyklen, die jeweils in einer Parallelen zu liegen kommen (Abb. 9 A und B, 42 h).

Mit Hilfe der BrdU/Hoechst-Quenching Technik lässt sich neben der detaillierten Zellzyklusanalyse auch die Fraktion der ruhenden G0-Zellen bestimmen (63). Man nutzt

dabei aus, dass alle proliferierenden Zellen im Gegensatz zur G<sub>0</sub>-Fraktion dem Verlauf des Schemas in Abb. 9 A folgen. G<sub>0</sub>-Zellen finden sich somit nach einer Langzeitinkubation mit BrdU, z. B. nach 96 h BrdU-Exposition, am Ausgangspunkt der G<sub>1</sub>-Zellen des ersten Zellzyklus (vgl. G<sub>1G1</sub>, Abb. 9 A).

## 2.3 FLUORESZENZ-RESONANZ-ENERGIE-TRANSFER

### 2.3.1 Grundlagen

Das Prinzip der Fluoreszenzfarbstoff-Anregung und -Emission beruht darauf, dass die Elektronen der Farbstoffmoleküle in Abhängigkeit des Farbstoff-spezifischen Absorptionsspektrums durch Absorption von Lichtquanten, z. B. eines Lasers, auf ein höheres Energieniveau gehoben werden, das sie unter Abgabe von Energie in Form von Photonen wieder verlassen. Die während des kurzzeitigen Durchtritts durch einen Laserstrahl emittierten Photonen werden von einem Objektiv aufgenommen und über eine Anordnung von optischen Linsen und Filtern, dichroitischen Spiegeln und Strahlteilern durch einen Photodetektor (PMT, *photo multiplier tube*) registriert (Abb. 3 und Abb. 4). Dabei ist die Menge an emittierten Photonen proportional zur Menge an gebundenen Farbstoffmolekülen an einer Zelle.

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) beschreibt die strahlungslose Übertragung von Energie von einem Donor-Farbstoff auf einen Akzeptor-Farbstoff (40). Wird ein Donor-Fluorophor durch monochromatisches Licht angeregt und überträgt dieser seine Energie auf den Akzeptor, so resultiert dies in einer Verringerung der Fluoreszenzintensität beim Donor (*Quenching*) und einer Erhöhung der Emission des Akzeptors (*sensitized emission*). Dafür müssen beide Farbstoffe folgende Kriterien erfüllen:

- Der räumliche Abstand zwischen Donor- und Akzeptor-Farbstoff darf nicht größer als 10 nm sein.
- Das Emissionsspektrum des Donors muss mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen (Abb. 10 B). Die Übertragung von Energie ist direkt proportional zu deren Überlappungsintegral.
- Der Donor muss eine hohe Quantenausbeute aufweisen.
- Die Dipolmomente beider Farbstoffe müssen parallel zueinander liegen, um den strahlungslosen Energietransfer zu ermöglichen (Abb. 10 C) (129).

Die Energietransfer-Effizienz  $E$  ist im Bereich bis 10 nm umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstandes der markierten Moleküle (vgl. Abb. 10 A). Damit ist die FRET-Technik eine äußerst sensitive Methode, um Distanzen und Distanzänderungen zweier Moleküle, wie z. B. der Oberflächenrezeptoren der erbB-Rezeptorfamilie, zu untersuchen (11).

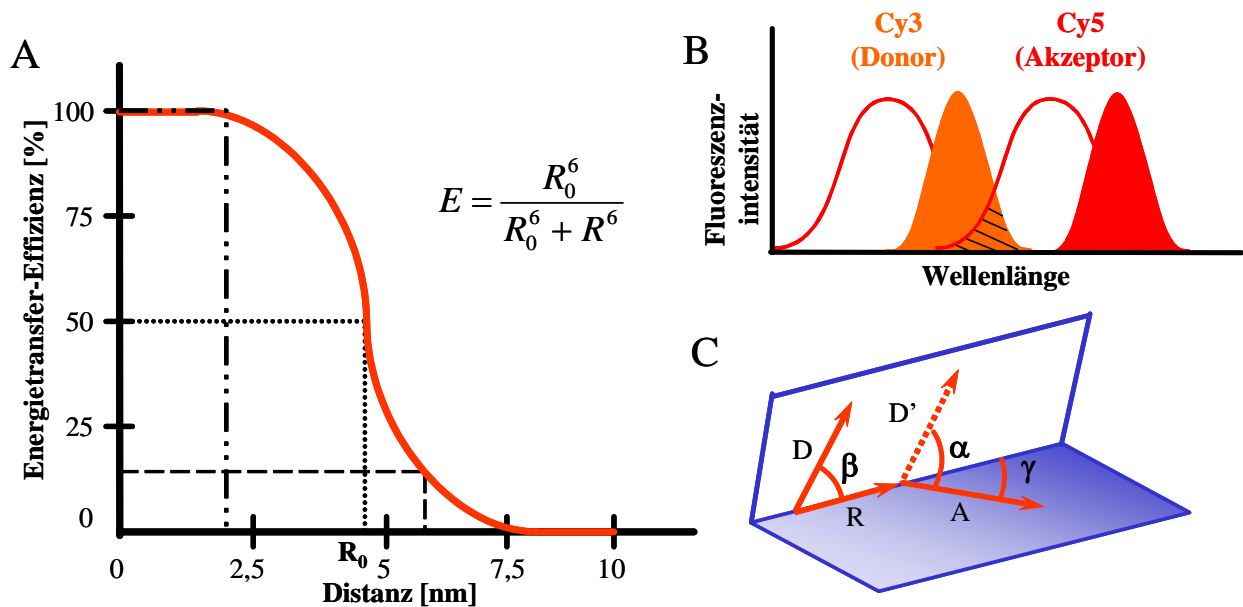
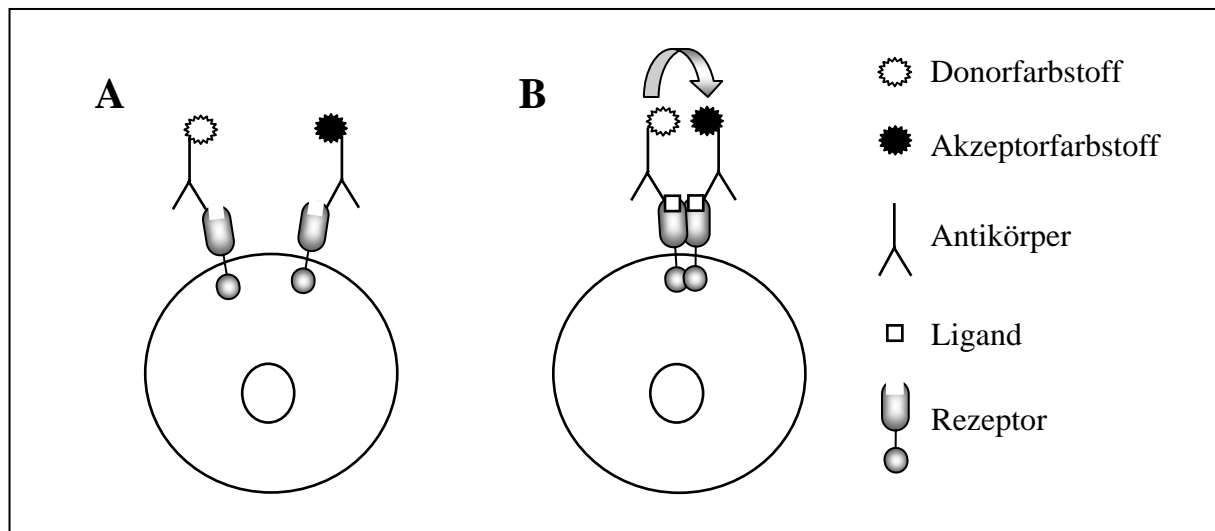


Abb. 10 A: Abstandsabhängigkeit der Effizienz des Energietransfers  $E$ . B: Überlappung (schraffierte Fläche) des Emissionsspektrums des Donor-Farbstoffs (orange Fläche) mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptor-Farbstoffs (rote Linie). C: Orientierung der Übergangsdipolmomente des Donor-Farbstoffs  $D$  und des Akzeptor-Farbstoffs  $A$ .  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ : Winkel zur Beschreibung der Orientierung der Dipolmomente,  $R$ : Abstand zwischen Donor und Akzeptor,  $R_0$ : Abstand bei halbmaximaler Energietransfer-Effizienz.

Die bei erbB-Rezeptoren durch die Bindung von Liganden (Wachstumsfaktoren oder Antikörpern) induzierte Rezeptor-Aggregation (Homo-/Heterodimerisierung) kann aufgrund der Distanzänderung von Rezeptoren im Vergleich zu unstimulierten Zellen mit Hilfe der FRET-Technik durchflusszytometrisch gemessen werden. Dies erlaubt im Gegensatz zu anderen gängigen Methoden zur Analyse von Protein-Interaktionen (z. B. Koimmunopräzipitation oder chemisches *Crosslinking*) die Untersuchung von Rezeptor-Wechselwirkungen in ihrer natürlichen Umgebung an lebenden, nicht manipulierten Zellen in ihrem physiologischen Zustand (113). Dazu färbt man die Zellen mit Farbstoff-markierten Antikörpern, die an das Ziel-Antigen binden (Abb. 11). Ohne Stimulierung der Zellen mit Ligand liegen die meisten Rezeptoren als Monomere vor (Abb. 11 A). Dadurch haben auch die an Antikörper gebundenen Fluorophore einen zu großen Abstand, um Energietransfer zu ermöglichen. Nach Liganden-induzierter Dimerisierung der Rezeptoren können Donor- und Akzeptor-Farbstoff näher aneinander gelangen und damit den Energietransfer ermöglichen (Abb. 11 B).



**Abb. 11: Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) aufgrund von Rezeptorinteraktion nach Stimulierung von Zellen mit Ligand. A: Ohne Ligand liegen die meisten Rezeptoren als Monomere vor. Der gegenseitige Abstand der über Antikörper an die Rezeptoren gebundenen Donor- und Akzeptor-Farbstoffe ist zu groß, um FRET zu ermöglichen. B: Nach Ligandenstimulierung und Rezeptor-Dimerisierung ist der Abstand der Fluorophore zueinander ausreichend klein, damit FRET stattfinden kann.**

### 2.3.2 Berechnung der Energietransfer-Effizienz

Mit Hilfe der Zwei-Laser-Anregung am FACSCalibur lässt sich die für FRET-Experimente notwendige Unterscheidung der Fluoreszenz des Donor-Farbstoffs (Cy3 bzw. PE, Messung in FL2), des Akzeptor-Farbstoffs (Cy5, Messung in FL4) und des Ausmaßes an Energietransfer von Donor auf den Akzeptor (Messung in FL3) treffen. Um die Berechnung der Energietransfer-Effizienz auf Einzelzellbasis anzustellen, sind mindestens vier Proben notwendig: ein farbstofffreier Versuchsansatz zur Bestimmung der Autofluoreszenz (Tab. 3: Probe A) und drei Proben, die mit Farbstoff-markierten Antikörpern gefärbt werden (Tab. 3: Proben B-D).

Proben-Nr.	Färbung	Bezeichnung der Probe
A	ungefärbt	Autofluoreszenz
B	Einzelfärbung mit Cy3 bzw. PE	Donor-only
C	Einzelfärbung mit Cy5	Akzeptor-only
D	Doppelfärbung Cy3 bzw. PE und Cy5	FRET

**Tab. 3: Für die Berechnung der Energietransfer-Effizienz auf Einzelzellbasis sind mindestens vier Proben herzustellen. Eine ungefärbte Probe (A) dient zur Bestimmung der Autofluoreszenz, die von allen weiteren Proben subtrahiert wird. Eine Einzelfärbung mit Donor-Farbstoff (Cy3 bzw. PE: Probe B) bzw. Akzeptor-Farbstoff (Cy5: Probe C) werden für die Korrektur spektraler Überlappungen und die Berechnung eines sog.  $\alpha$ -Faktors benötigt (vgl. unten). Die Probe D wird sowohl mit Donor- als auch mit Akzeptor-Farbstoff gefärbt. Mit dieser sog. FRET-Probe wird die Energietransfer-Effizienz berechnet.**



Die mit Donor-Farbstoff (Cy3 bzw. PE) gefärbte „Donor-only“ Probe und die mit Akzeptor-Farbstoff (Cy5) gefärbte „Akzeptor-only“ Probe dienen zur Bestimmung der Korrekturfaktoren  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  und  $S_4$ , die die spektrale Überlappung des Donor- bzw. des Akzeptor-Farbstoffs aus ihren Detektionskanälen FL2 (Anregungswellenlänge: 488 nm) bzw. FL4 (Anregungswellenlänge: ~ 635 nm) in benachbarte Kanäle ausgleichen (Tab. 4).

Parameter	zur Bestimmung verwendete Probe	Laseranregung bei	spektrale Überlappung	
			von Kanal	in Kanal
$S_1$	Donor-only	488 nm	FL2	FL3
$S_2$	Akzeptor-only	635 nm	FL4	FL3
$S_3$	Donor-only	488 nm	FL2	FL4
$S_4$	Akzeptor-only	635 nm	FL4	FL2

**Tab. 4:** Die S-Faktoren beschreiben die spektrale Überlappung der Fluoreszenz von einem Kanal in einen weiteren.  $S_1$  und  $S_3$  werden mit der Donor-only Probe bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm,  $S_2$  und  $S_4$  mit der Akzeptor-only Probe (Anregungswellenlänge ~ 635 nm) bestimmt.  $S_1$ - $S_4$  definieren sich über den Quotienten der Fluoreszenzintensitäten in den angegebenen Kanälen.

$S_1$  und  $S_3$  ergeben sich aus den gemessenen Fluoreszenzen der Donor-only Probe,  $S_2$  und  $S_4$  werden mit der Akzeptor-only Probe bestimmt. Dabei erfolgt die Berechnung von  $S_1$ - $S_4$  anhand der folgenden Definition:

$$S_1 = \frac{FL3}{FL2}, \quad S_2 = \frac{FL3}{FL4}, \quad S_3 = \frac{FL4}{FL2}, \quad S_4 = \frac{FL2}{FL4}.$$

Als ein weiterer Korrekturfaktor wird der gerätespezifische Parameter  $\alpha$  bestimmt, der die unterschiedliche Sensitivität in der Detektion durch das Durchflusszytometer für die Fluoreszenzsignale der Donor-only Probe in Kanal 2 ( $FL2^D$ ) und der Akzeptor-only Probe in Kanal 3 ( $FL3^A$ ) ausdrückt und nach Gleichung 1 ermittelt wird (113):

$$\alpha = \frac{FL3^A}{FL2^D} \cdot \frac{\varepsilon_{488}^D L^D B^D}{\varepsilon_{488}^A L^A B^A} \quad \text{Gleichung 1}$$

D: Donor (Cy3 bzw. PE)

A: Akzeptor (Cy5)

$\varepsilon$ : Extinktionskoeffizient bei 488 nm Laser-Anregung

L: Farbstoff/Protein-Verhältnis der markierten Antikörper

B: Zahl der mit Donor bzw. Akzeptor markierten Antigene pro Zelle

Der Quotient aus den Extinktionskoeffizienten geht mit  $\frac{\varepsilon_{488}^{Cy3}}{\varepsilon_{488}^{Cy5}} = 15$  bzw. mit  $\frac{\varepsilon_{488}^{PE}}{\varepsilon_{488}^{Cy5}} = 85,5$  für

die Farbstoffpaare Cy3/Cy5 bzw. PE/Cy5 in die Berechnung mit ein (Horvath G., persönliche Kommunikation). Für die Werte  $L^D$  und  $L^A$  wird jeweils das Markierungsverhältnis von Farbstoff zu Antikörper eingesetzt. Der Quotient  $B^D/B^A$  beschreibt für die Donor- und Akzeptor-only Proben die Zahl der mit Donor besetzten Antigene im Verhältnis zu der Anzahl, die mit Akzeptor markiert wurden. In allen durchgeführten Experimenten konnte dieser Quotient dadurch eliminiert werden, dass für die Donor- und die Akzeptor-only Probe Farbstoff-markierte Antikörper des gleichen Klon verwendet wurden. Da diese Antikörper das identische Zielprotein und zugleich das gleiche Epitop erkennen, ist die Zahl der mit Donor bzw. Akzeptor markierten Antigene äquivalent. Es gilt somit:  $B^D/B^A = 1$ .

Als vierte Probe (Tab. 3: Probe D) benötigt man sowohl mit Donor- als auch mit Akzeptor-Farbstoff markierte Zellen. Mit Hilfe der Gleichungen 2-4 lässt sich schließlich die Energietransfer-Effizienz  $E$  in dieser doppelt gefärbten Probe mit dem Programm AFlex berechnen (vgl. 2.3.3) (127).

$$I_1 = I_D \cdot (1 - E) + I_A \cdot S_4 + I_D \cdot E \cdot \alpha \cdot \frac{S_4}{S_2} \quad \text{Gleichung 2}$$

$$I_2 = I_D \cdot (1 - E) \cdot S_1 + I_A \cdot S_2 + I_D \cdot E \cdot \alpha \quad \text{Gleichung 3}$$

$$I_3 = I_D \cdot (1 - E) \cdot S_3 + I_A + I_D \cdot E \cdot \alpha \cdot \frac{S_3}{S_1} \quad \text{Gleichung 4}$$

Dazu werden die Fluoreszenzintensitäten FL2, FL3 und FL4 der FRET-Probe für jede Zelle einzeln gemessen (135). Diese Intensitäten in FL2, FL3 bzw. FL4 gehen als Parameter  $I_1$ ,  $I_2$  und  $I_3$  in die Gleichungen 2-4 ein, die den Zusammenhang zwischen der Energietransfer-Effizienz  $E$ , den gemessenen Fluoreszenzintensitäten  $I_{1-3}$ , der spektralen Überlappung  $S_{1-4}$ , dem Geräte-spezifischen Faktor  $\alpha$  und den bei den unterschiedlichen Anregungswellenlängen für Donor und Akzeptor vorherrschenden Extinktionskoeffizienten herstellen.  $I_A$  bzw.  $I_D$  repräsentieren die Fluoreszenzintensität des Akzeptors A bzw. des Donors D, die beide ohne Energietransfer aufweisen würden, d. h. wenn kein Donor-*Quenching* und keine Erhöhung der Fluoreszenz des Akzeptors durch Energietransfer stattfinden würde.

Beim Auflösen der drei Gleichungen lassen sich mit  $I_D$  und  $I_A$  zwei der drei Unbekannten  $E$ ,  $I_D$  und  $I_A$  eliminieren und es ergibt sich die Energietransfer-Effizienz  $E$  als  $A = \frac{E}{1 - E}$  nach Gleichung 5 (G. Horváth, Universität Debrecen, Ungarn, persönliche Kommunikation).

$$A = \frac{E}{1 - E} = \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{S_1 S_2 [I_2 (1 - S_3 S_4) - I_1 (S_1 - S_2 S_3) - I_3 (S_2 - S_1 S_4)]}{(S_1 - S_2 S_3) (I_1 S_2 - I_2 S_4)} \quad \text{Gleichung 5}$$

### 2.3.3 Die Software AFlex (Spezialsoftware)

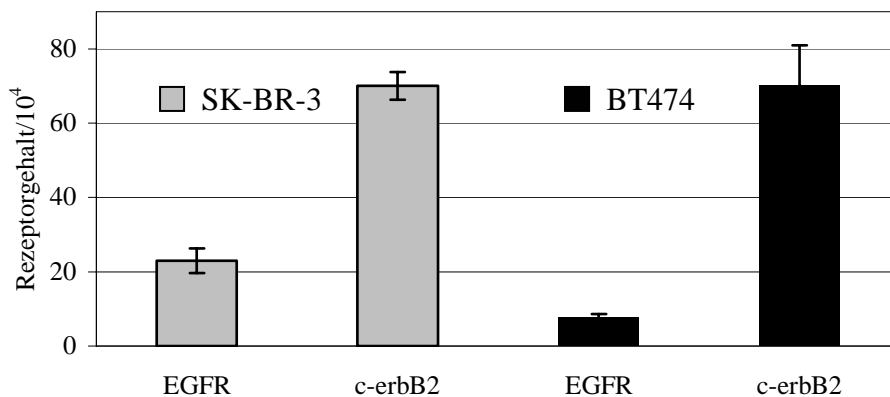
Die *list-mode* Datenfiles des Formats FCS 2.0 der Energietransfer-Messungen am FACSCalibur wurden zur Weiterbearbeitung auf einen Standard-PC mit dem Betriebssystem Windows XP übertragen und mit dem Programm AFlex ausgewertet. Die Software AFlex bietet als Arbeits- und Eingabefläche ein Excel-Arbeitsblatt und ein weiteres Fenster, in dem die Daten der Messung am FACSCalibur in *Dot-Plots* oder Histogrammen dargestellt, Populationen in unterschiedlicher Farbkodierung markiert und „gegatet“ werden können (127).

Für jede der vier für eine Berechnung der Energietransfer-Effizienz notwendigen Proben (Tab. 3) ist eine Zeile und darin für jeden Parameter, wie z. B. die Hintergrundfluoreszenzen,  $S_1$ - $S_4$ , den  $\alpha$ -Faktor oder die Energietransfer-Effizienz  $E$ , eine Excel-Zelle vorgesehen, in der die Software den jeweiligen berechneten Wert einträgt. Der Benutzer kann für jede einzelne Excel-Zelle separat bestimmen, für welche ausgewählte Population aus jedem der selbst definierten *Dot-Plots* oder Histogramme ein Parameter berechnet werden soll. Für die doppelt gefärbte FRET-Probe verwendet die Software für jede einzelne Zelle dessen Datensatz mit den Signalen aus FSC, SSC und FL1-4 aus dem *list-mode* File und berechnet unter Berücksichtigung der spektralen Überlappungen  $S_1$ - $S_4$  und des  $\alpha$ -Faktors die Energietransfer-Effizienz  $E$  (vgl. Gleichungen 2-4 bzw. 5 unter 2.3.2). Der Energieübertrag wird dabei für jede Zelle einzeln ermittelt, wodurch der Heterogenität in einer Zellpopulation Rechnung getragen wird, und in einem annähernd normalverteilten Histogramm darstellt (127). Dabei wird die Autofluoreszenz der Kontrollmessung (Tab. 3: Probe A) in den Kanälen FL2, FL3 und FL4 automatisch von der gemessenen Fluoreszenzintensität subtrahiert.

### 3 MATERIALIEN

#### 3.1 UNTERSUCHTE ZELLINIEN

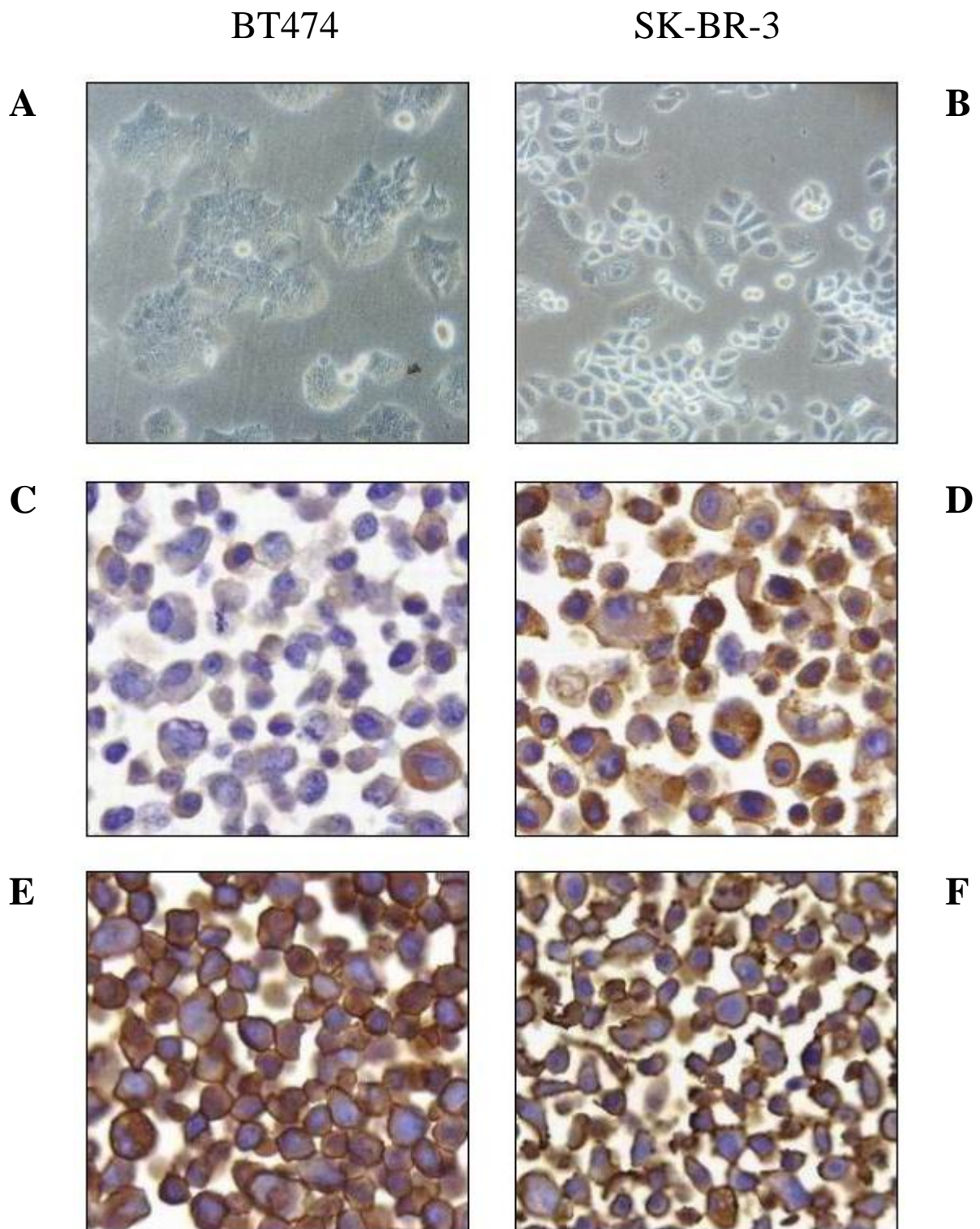
Für die Experimente im Rahmen der vorliegenden Dissertationsschrift wurden die zwei Mammakarzinom-Zelllinien BT474 und SK-BR-3 ausgewählt (vgl. Abb. 13 A und B), da diese ein unterschiedliches Koexpressionsmuster der erbB-Rezeptoren EGFR und c-erbB2 aufweisen (Abb. 12). Vorarbeiten mit diesen Linien haben ein unterschiedliches Wachstumsverhalten gezeigt (11). Ein Schwerpunkt dieser Dissertationsarbeit besteht darin, das Wachstumsverhalten mit dem spezifischen EGFR/c-erbB2-Koexpressionsmuster in Verbindung zu bringen. Beide Mammakarzinom-Zelllinien zeigen einen identischen Level an Überexpression des c-erbB2 (vgl. immunhistochemische Färbungen in Abb. 13 E und F). Jedoch weist SK-BR-3 mit  $2,2 \times 10^5$  EGF-Rezeptoren pro Zelle im Vergleich zu BT474 mit  $7,6 \times 10^4$  EGF-Rezeptoren pro Zelle eine etwa dreimal so starke Expression dieses Rezeptors auf (11). Eine Quantifizierung der EGFR- und c-erbB2-Expression bei BT474 und SK-BR-3 ist in Abb. 12 dargestellt und wird durch die immunhistochemischen Färbungen in Abb. 13 C - F veranschaulicht. C-erbB3 und c-erbB4 werden von beiden Zelllinien nur auf einem sehr geringen Level von  $1 \times 10^4$  bzw.  $1,1 \times 10^4$  Rezeptoren pro Zelle exprimiert (11).



**Abb. 12: Rezeptorquantifizierung von EGFR und c-erbB2 bei den Mammakarzinom-Zelllinien SK-BR-3 (grau) und BT474 (schwarz). Der EGFR wird von SK-BR-3 bzw. BT474 auf einem Level von  $2,2 \times 10^5$  bzw.  $7,6 \times 10^4$  Rezeptoren pro Zelle exprimiert. Beide Zelllinien weisen mit ca.  $7 \times 10^5$  Molekülen an c-erbB2 pro Zelle ein ähnliches Expressionsniveau in Bezug auf diesen Rezeptor auf (11).**

Die Tumorzelllinie SK-BR-3 wurde von einem gering differenzierten, metastasierenden Adenokarzinom der Brustdrüse einer 43-jährigen Frau isoliert (33). Aus histologischer Sicht bestand bei der hypertri- bis hypotetraploiden Zelllinie ein Differenzierungsgrad von G2 bis G3. SK-BR-3 Zellen besitzen eine Amplifikation des *c-erbB2* Gens, was zur Überexpression des c-erbB2 Proteins führt (Abb. 12) (128). Progesteronrezeptoren wurden ebenfalls nachge-

wiesen (19), über die Expression von Östrogenrezeptoren lassen sich jedoch unterschiedliche Literaturangaben finden (19,64).



**Abb. 13:** Es sind Phasenkontrastaufnahmen der Zelllinien BT474 (A) und SK-BR-3 (B) und immunhistochemische Färbungen von Zytospinpräparaten (C-F) einer EGFR Färbung (C: BT474, D: SK-BR-3) und einer c-erbB2 Färbung (E: BT474, F: SK-BR-3) gezeigt.

BT474 ist eine hypertetraploide Mammakarzinom-Zelllinie. Sie wurde aus einem invasiven, soliden, duktalem Karzinom der Brust einer 60-jährigen Patientin isoliert (33) und histologisch mit einem Differenzierungsgrad von G2 bis G3 beschrieben. Wie die Zelllinie SK-BR-3 besitzt BT474 ein amplifiziertes *c-erbB2* Gen, was die Überexpression des c-erbB2 Proteins bedingt (Abb. 12) (128). Östrogen- und Progesteronrezeptoren wurden nachgewiesen (125). Zum Vergleich des Effekts von BrdU auf die Zellproliferation von BT474 und SK-BR-3 wurden die beiden Harnblasenkarzinom-Zelllinien J82 (BrdU-insensitiv) und RT4 (BrdU-sensitiv) als Kontrollen herangezogen (32). Die triploide Zelllinie J82 repräsentiert den Phänotyp eines invasiven, wenig differenzierten Harnblasenkarzinoms, die tetraploide Zelllinie RT4 leitet sich von einem papillären, hochdifferenzierten Tumor des Urothels der Harnblase ab (33).

### 3.2 MEDIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE ZELLKULTUR

DMEM	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
DMSO	Merck, Darmstadt
Einfriermedium	DMEM mit 10% FKS und 10% DMSO
FKS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
PBS	Biochrom AG, Berlin
Phenolrot	Biochrom AG, Berlin
RPMI-1640	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Trypsin mit EDTA	PAN Biotech GmbH, Aidenbach

### 3.3 ANTIKÖRPER

#### • Primärantikörper

anti-c-erbB2, Klon 2C4, Cy3-markiert	Prof. Dr. J. Szöllösi, Universität Debrecen, Ungarn
anti-c-erbB2, Klon 2C4, Cy5-markiert	Prof. Dr. J. Szöllösi, Universität Debrecen, Ungarn
anti-c-erbB2, Klon 4D5, Cy3-markiert	Prof. Dr. J. Szöllösi, Universität Debrecen, Ungarn
anti-c-erbB2, Klon 4D5, Cy5-markiert	Prof. Dr. J. Szöllösi, Universität Debrecen, Ungarn
anti-EGFR, Klon EGFR.1, unmarkiert	Dianova, Hamburg
anti-EGFR, Klon EGFR.1, PE-markiert	BD Bioscience, Heidelberg
anti-EGFR, Klon EGFR.1, Cy5-markiert	BD Bioscience, Heidelberg; Cy5-Markierung durch AG Prof. Dr. J. Szöllösi, Universität Debrecen, Ungarn
Herceptin (geschützter Handelsname)	Genentech, South San Francisco, CA, USA
mouse anti-BrdU, Klon Bu20a	DakoCytomation, Hamburg
mouse anti-Phosphotyrosin IgG2b, Klon PY20, biotinyliert	Biosource, Solingen
rabbit anti-human HER2/ErbB2, polyklonal	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
rabbit anti-human Phospho-HER2/ErbB2 (Tyr877), polyklonal	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
rabbit anti-human Phospho-HER2/ErbB2 (Tyr1112), polyklonal	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
rabbit anti-human Phospho-HER2/ErbB2 (Tyr1248), polyklonal	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA

#### • Sekundärantikörper und Fab-Fragmente

FITC-konjugierter rabbit anti-mouse Antikörper (FITC Isomer 1)	DakoCytomation, Hamburg
goat anti-mouse IgG (H+L) Fab-Fragment, Cy3-markiert	Dianova, Hamburg

*goat anti-mouse* IgG (H+L) Fab-Fragment, unmarkiert  
*goat anti-rabbit* HRP-konjugierter Antikörper,  
 polyklonal

Dianova, Hamburg  
 Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA,  
 USA

### 3.4 DNA-FARBSTOFFE, ENZYME UND WACHSTUMSFAKTOREN

- DNA-Farbstoffe

Hoechst33258  
 Propidiumiodid

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

- Enzyme

Pepsin  
 RNase  
 Streptavidin-HRP

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen  
 R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

- Wachstumsfaktoren

EGF, rekombinant vom Menschen (MG 6023 kDa)  
 HRG, Isoform  $\beta 1$ , rekombinant vom Menschen  
 (MG 7884 kDa)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen  
 R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

### 3.5 GEBRAUCHSFERTIG ZUSAMMENGESTELLTE REAGENZIEN (KITS)

BCA-Protein-Assay-Kit  
 ECL-plus Western-Blotting *Detection System*  
*Human* EGFR [pY1173] ELISA-Kit  
*Human Full Length* EGFR ELISA-Kit  
*Human* sp185<sup>Her-2</sup> ELISA-Kit  
 TACS Annexin-V-FITC Kit

Pierce, Niederlande  
 Amersham Biosciences, England  
 Biosource Deutschland GmbH, Solingen  
 Biosource Deutschland GmbH, Solingen  
 Biosource Deutschland GmbH, Solingen  
 R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

### 3.6 REAGENZIEN UND CHEMIKALIEN

$\beta$ -Mercaptoethanol  
 2'-Desoxycytidin  
 5-Bromo-2'-desoxyuridin  
 Acrylamid-Stammlösung (40%)  
 Bromphenolblau  
 BSA  
 EDTA  
 EGTA  
 Glycerin  
 Glycin  
 Igepal CA-630  
 Paraformaldehyd  
 Natriumazid  
 Methanol  
 PMSF  
*Precision Protein Standard*  
 Salzsäure  
 SDS  
 TEMED  
 Proteaseinhibitor Cocktail 10 $\times$   
 Tris  
 Tween 20  
 Zelllysepuffer

Merck, Darmstadt  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen  
 Roth, Karlsruhe  
 Merck, Darmstadt  
 Biotest AG, Dreieich  
 Serva, Heidelberg  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen  
 Merck, Darmstadt  
 Merck, Darmstadt  
 Merck, Darmstadt  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen  
 Merck, Darmstadt  
 Merck, Darmstadt  
 AppliChem, Darmstadt  
 Biorad Laboratories GmbH, München  
 Merck, Darmstadt  
 Merck, Darmstadt  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen  
 Merck, Darmstadt  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen  
 Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA,  
 USA

### 3.7 PUFFER UND LÖSUNGEN

DNA-Puffer	100 mM	Tris-HCl (pH 7,4)
	0,9 %	NaCl
	1 mM	CaCl <sub>2</sub>
	0,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,2 %	BSA (Zugabe kurz vor Gebrauch)
PFA	4 %	Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4)
PBS	137 mM	NaCl
	6,5 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	2,7 mM	KCl
TE-Puffer	25 mM	Tris-HCl (pH 7,6)
	1 mM	EDTA
Zusammensetzung des Polyacrylamidgels:		
Sammelgel (4%-ig)		
	3,05 ml	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
	1,25 ml	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
	50 µl	SDS (10 %)
	650 µl	Acrylamid-Stammlösung (40 %)
	25 µl	APS (10 %)
	5 µl	TEMED
Trenngel (7,5%-ig)		
	5,465 ml	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
	2,5 ml	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
	10 µl	SDS (10 %)
	1,875 ml	Acrylamid-Stammlösung (40 %)
	50 µl	APS (10 %)
	10 µl	TEMED
Laufpuffer 5×	20 mM	Tris-HCl (pH 8,3)
	195 mM	Glycin
	1 %	SDS
SDS-Probenpuffer 2×	20 %	Glycerin
	1,25 M	Tris-HCl (pH 6,8)
	4 %	SDS
	0,02 %	Bromphenolblau
	10 %	β-Mercaptoethanol (Zugabe kurz vor Gebrauch)
Anodenpuffer 1	300 mM	Tris-HCl (pH 10,4)
	20 %	Methanol
Anodenpuffer 2	25 mM	Tris-HCl (pH 10,4)
	20 %	Methanol
Kathodenpuffer	4 mM	ε-Amino-n-Caprinsäure (pH 7,6)
	20 %	Methanol
AP-Puffer 10×	1 M	Tris-HCl (pH 7,4)
	1 M	NaCl
	25 mM	MgCl <sub>2</sub>



AP-T-Puffer	0,1 %	Tween 20 in AP-Puffer 1×
PMSF-Stammlösung	100 mM	in Isopropanol (-20°C)
Zelllysepuffer	20 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	150 mM	NaCl
	1 mM	Na <sub>2</sub> EDTA
	1 mM	EGTA
	1 %	Triton-X 100
	2,5 mM	Natriumpyrophosphat
	1 mM	β-Glycerophosphat
	1 mM	Natriumvanadat
	1 µg/ml	Leupeptin
	1 mM	PMSF (Zugabe kurz vor Gebrauch)
	1:10 verd.	Proteaseinhibitor 10× (Zugabe kurz vor Gebrauch)
Annexin-V Färbelösung	10 µl	Bindungspuffer 10×
	1 µl	Annexin-V
	89 µl	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>

### 3.8 VERBRAUCHSMATERIAL

Gewebe-Kulturflaschen T25 (100 ml)	Greiner, Solingen
Gewebe-Kulturflaschen T75 (250 ml)	Greiner, Solingen
Gewebe-Kulturflaschen T175 (600 ml)	Greiner, Solingen
Hyperfilm	Amersham Pharmacia Biotech, England
Kryoröhrchen	Greiner, Solingen
Mikrotiterplatten	Falcon, Heidelberg
Polystyrol Rundbodenröhrchen 5 ml	Falcon, Heidelberg
PVDF-Membran	Roche Diagnostics, Mannheim
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Trägerflüssigkeit FACSTFlow	BD Biosciences, Heidelberg
Universalindikator pH 0-14	Merck, Darmstadt
Zellschaber	Greiner, Solingen
Zellsiebe - <i>Cellstrainer</i>	Falcon, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Solingen

### 3.9 GERÄTE

Beschallungsgerät Labsonic U	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen
Biorad 200/2,0 <i>Constant Voltage</i>	Biorad Laboratories GmbH, München
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer FACStar <sup>PLUS</sup>	BD Biosciences, Heidelberg
ELISA-Reader	MWG Biotech, Ebersberg
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hiz GmbH, Hamburg
Inkubator Heraeus 6000	Heraeus Sepatech, Osterode
Labovort FS	Leitz Messtechnik GmbH, Wetzlar
Magnetrührer RCT <i>basic</i>	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Milli Q <i>Water System</i>	Millipore S. A., Molsheim, Frankreich
Mini Protean 3 Elektrophorese-Einheit	Biorad Laboratories GmbH, München
Einfriergerät NICOOL LM 10	Air Liquide, Düsseldorf
pH-Meter WTW pH522	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH & Co, Weilheim
Pulsflächenanalysegerät Casy1 Model TCC	Schärfe System, Reutlingen
Sterilbank LaminAir HBB 2472 S	Heraeus Sepatech, Osterode
Unimax 1010	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Vortex REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach

Waage Sartorius R16OP

Wasserbad GFL 1083

Western-Blot Kammer

Whatman Filterpapier

Zentrifugen: Tischzentrifuge *Centrifuge* 5415

Tischzentrifuge Biofuge pico

Megafuge 1.0 R

Varifuge 3.2RS

Sartorius, Göttingen

Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

Biometra, Göttingen

Laborcenter, Nürnberg

Eppendorf, Hamburg

Heraeus Sepatech, Osterode

Heraeus Sepatech, Osterode

Heraeus Sepatech, Osterode

## 4 METHODEN

### 4.1 METHODEN DER ZELLKULTIVIERUNG UND ZELLPRÄPARATIONEN

#### 4.1.1 Standardkultur

Alle Zelllinien wurden als adhärent wachsende Monolayer in Gewebe-Kulturflaschen oder 6-Well-Platten kultiviert und in Brutschränken bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt, 20% O<sub>2</sub>-Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Inkubation der Mammakarzinom-Zelllinien erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 5% fötalem Kälberserum (FKS) und 0,2% Phenolrot, die der Harnblasenkarzinom-Zelllinien in *Roosevelt Park Memorial Institute* (RPMI)-1640 Medium mit 5% FKS. In zweitägigem Abstand wurde das Medium gewechselt.

- Ernte von Zellen und Bestimmung der Zellzahl

Alle zellbiologischen Arbeiten erfolgten unter einer Sterilbank (LaminAir Flow). Für die Ernte wurden die adhärennten Zellen 1 × mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) gewaschen und mit 0,25% Trypsin und 0,02% EDTA in PBS vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe eines zweifachen Volumens an FKS-haltigem Medium gestoppt, die Suspension in ein 50 ml Röhrchen überführt und bei 1200 rpm für 5 min abzentrifugiert. Sollten Zellen für FRET-Analysen geerntet werden, erfolgte das Abstoppen der Trypsin-Reaktion durch Zugabe von kaltem Medium und Überführen der Zellen auf Eis.

Nach Abzentrifugieren der Zellen waren diese in Medium zu resuspendieren, zu vereinzeln und - falls eine bestimmte Anzahl von Zellen wieder ausgesät werden sollte - die Zellzahl mit dem Zellzählgerät Casy1 Model TCC zu bestimmen.

- Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen, die langfristig in flüssigem Stickstoff eingelagert werden sollten, wurden nach der Ernte bei 1200 rpm für 5 min pelletiert, in kaltem Einfriermedium (DMEM mit 10% FKS und 10% Dimethylsulfoxid, DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen eingefüllt. Mit Hilfe des Einfriergeräts NICOOL LM 10 konnten die Zellen langsam bis auf -100°C abgekühlt und anschließend in einem Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Um Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen, rasch im 37°C-Wasserbad aufgetaut, die Zellen 1 × mit Medium gewaschen und

in T25-Kulturgefäßen ausgesät. Nach einem Mediumwechsel am Folgetag konnte die Zellkultur - wie oben beschrieben - fortgeführt werden.

#### 4.1.2 Stimulation mit Wachstumsfaktoren und Herceptin

Von den beiden Zelllinien BT474 und SK-BR-3 wurden je 6 unterschiedlich behandelte Zellkulturansätze für anschließende Analysen vorbereitet. Es sollte eine unstimulierte Kontrollprobe (Tab. 5: A) mit Zellen verglichen werden, die den Stimuli EGF (B), EGF/Herceptin (C), HRG (D), HRG/Herceptin (E) oder Herceptin (F) ausgesetzt waren.

Ansatz	EGFR-spezifischer Wachstumsfaktor	c-erbB3 und c-erbB4 Rezeptor spezifischer Wachstumsfaktor	anti-c-erbB2 Antikörper
A (Kontrolle)	–	–	–
B	EGF	–	–
C	EGF	–	Herceptin
D	–	HRG	–
E	–	HRG	Herceptin
F	–	–	Herceptin

**Tab. 5: Übersicht über die Behandlungsmodi. Die Applikation von EGFR- bzw. c-erbB3/c-erbB4-spezifischen Wachstumsfaktoren (EGF bzw. HRG) wird mit der Zugabe des c-erbB2-spezifischen, therapeutisch wirksamen Antikörpers Herceptin kombiniert.**

Bei Langzeitinkubationen wurden die Wachstumsfaktoren bzw. Herceptin in Konzentrationen von 5 nM (EGF: 30 ng/ml, HRG: 40 ng/ml) bzw. 65 nM (10 µg/ml) verwendet und bei jedem Mediumwechsel die entsprechenden Reagenzien wieder zugesetzt. War nur eine kurze Stimulation von 5 min für EGF bzw. 10 min für HRG vorgesehen, kam eine Konzentration von jeweils 15 nM zum Einsatz. Für die kombinierte Applikation von EGF und Herceptin bzw. HRG und Herceptin erfolgte vor der Zugabe der Wachstumsfaktoren die Inkubation mit 65 nM Herceptin für 40 min bei EGF und für 35 min für HRG. Für die Zellen, die ausschließlich mit Herceptin behandelt werden sollten, fand eine 45-minütige Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper statt. Alle Ansätze wurden gemeinsam geerntet und sofort auf Eis gestellt.

Für die Energietransfer-Experimente wurden die 6 Möglichkeiten zur Zellbehandlung (Tab. 5) wie folgt aufgeteilt und für die beiden Zelllinien BT474 und SK-BR-3 zugleich entweder Behandlungsmodus 1 oder 2 durchgeführt:

Behandlungsmodus 1: unstimuliert, EGF, EGF/Herceptin, Herceptin

Behandlungsmodus 2: unstimuliert, HRG, HRG/Herceptin, Herceptin

#### 4.1.3 BrdU-Inkubation und Zellpräparation für Pulsmarkierung

Die Zugabe und die Inkubation von Zellen mit BrdU wurde unter abgedunkelten Bedingungen durchgeführt. Dies sollte die Zellen, die aufgrund des Einbaus von BrdU in die DNA sensitiv gegenüber kurzwelligem Licht sind, vor Licht-induzierten DNA-Schäden schützen. Um direkte Lichteinstrahlung zu vermeiden, wurden die Kulturflaschen zur Inkubation im Brutschrank zusätzlich in Aluminiumfolie eingewickelt.

Pro Messzeitpunkt wurden  $6 \times 0,3$  Mio Zellen von BT474 bzw. SK-BR-3 am Morgen des ersten Tags in T25-Kulturflaschen mit 5% FKS-haltigem DMEM ausgesät. Am Nachmittag wurde dieses entfernt und durch Medium mit 2% FKS ersetzt. Am Tag 2 erfolgte die Zugabe der Wachstumsfaktoren und Herceptin bzw. deren Kombinationen wie unter 4.1.2 für eine Langzeitinkubation beschrieben. Nach weiteren 24 Stunden war für alle 6 Proben der BrdU-Puls vorgesehen. Dazu sollte dem Medium 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) und 2'-Desoxycytidin (DC) in Endkonzentrationen von 20  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$  zugesetzt werden (32). Die Zugabe von DC diente dazu, eventuelle BrdU-induzierte Störungen des Nukleotidstoffwechsels zu vermeiden (25,57). Nach 30-minütiger Inkubationszeit im Brutschrank wurden die Zellen  $4 \times$  mit 2% FKS enthaltendem Medium gewaschen und anschließend mit DMEM und den entsprechenden Wachstumsfaktoren in den benötigten Konzentrationen versetzt. Nach den gewünschten Inkubationszeiten wurden die Zellen trypsiniert, zweimal mit kaltem PAB<sup>2</sup> (PBS/ 0,01% Natriumazid,  $\text{NaN}_3$ / 2% BSA) gewaschen und mit 65%-igem Methanol über Nacht bei 4°C im Dunkeln fixiert.

Vor der Färbung wurden 0,5 Mio fixierter Zellen  $2 \times$  mit kaltem PAB<sup>2</sup> gewaschen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für je 3 min bei 1200 rpm. Das Zellpellet wurde in 100  $\mu\text{l}$  PAB<sup>2</sup> resuspendiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, um nach einmaligem Waschen eine Inkubation in 50  $\mu\text{l}$  PAB<sup>2</sup> plus 100  $\mu\text{l}$  RNase A (Stammlösung: 1 mg/ml; 50 - 100 Units/mg) anzuschließen (12 min bei 37°C im Wasserbad, anschließend 40 min bei RT). Nach einem Waschschriff und der Resuspendierung der Zellen in 50  $\mu\text{l}$  PAB<sup>2</sup> war eine 3-minütige Inkubation bei 37°C vorgesehen. Anschließend wurde 1 ml frisch hergestellte Pepsinstammlösung zugesetzt, um die Zytoplasmamembran und das Zytoplasma der Zellen zu verdauen, die durch unspezifische Bindung von Farbstoff und Antikörpern die Auflösung der anti-BrdU Messungen verringern würden. Zur Herstellung der Pepsinstammlösung mussten 5 mg Pepsin für 2 min in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  gelöst und mit 14 ml einer 37°C-warmen 0,01 M HCl-Lösung gemischt werden. Nach 4-minütiger Inkubation des Pepsinverdaus wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 3 ml kaltem PAB<sup>2</sup> gestoppt und die Zellkerne 4 min bei 1500 rpm abzentrifugiert. Im anschließenden Schritt erfolgte die Denaturierung der DNA mit

Salzsäure, um dem gegen BrdU gerichteten Antikörper den Zugang zum Antigen zu ermöglichen. Dazu wurden die Zellkerne in 400 µl 2 M HCl resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Die darauf folgenden Waschschrte mussten so oft wiederholt werden, bis der pH-Wert der Suspension im neutralen Bereich lag. Nach Abzentrifugation (1500 rpm, 4 min) wurden die Zellkerne in 50 µl des primären, gegen BrdU gerichteten Antikörpers (Endkonz.: 10 µg/ml in PAB<sup>2</sup>) für 45 min im Dunkeln und auf Eis inkubiert. Nach einmaligem Waschen folgte eine 30-minütige Inkubation mit 50 µl des FITC-konjugierten Sekundärantikörpers bei einer Endkonzentration von 54 µg/ml. Anschließend wurden die Zellkerne einmal gewaschen und in 200 µl PAB<sup>2</sup> mit 2,5 µg/ml PI resuspendiert. Die Messung erfolgte am FACSCalibur mit den in Tab. 11 aufgelisteten Geräteeinstellungen.

#### *4.1.4 Analyse des Effekts einer BrdU-Pulsmarkierung auf die Zellproliferation*

Um die Zellproliferation von BT474 und SK-BR-3 auf eine Beeinflussung durch eine Pulsmarkierung mit BrdU zu untersuchen, wurden je 0,3 Mio Zellen in Parallelansätzen am Tag 1 in T25-Kulturflaschen in DMEM mit 5% FKS ausgesät, am Tag 4 wie für die anti-BrdU Technik (vgl. 4.1.3) bzw. die BrdU/Hoechst Quenching Technik (Positivkontrolle für einen BrdU-induzierten Effekt, vgl. 4.1.5) mit BrdU behandelt und nach 24 h, 48 h oder 96 h geerntet. Für jeden Zeitpunkt wurden unbehandelte Zellen als Kontrolle mitgeführt. Von jeder Probe wurde die Zellzahl und anhand einer einparametrischen DNA-Färbung die SPF bestimmt.

#### *4.1.5 BrdU-Inkubation und Zellpräparation für BrdU/Hoechst-Quenching Technik*

0,5 Mio Zellen wurden am Tag 1 in T75-Kulturgefäßen mit 5%-FKS-haltigem Medium ausgesät. Am Tag 4 oder Tag 6 wurde BrdU in den Konzentrationen 3,5 µM, 5 µM bzw. 60 µM und DC in den entsprechenden halb-äquimolaren Konzentrationen zugegeben (24,57). An Tag 4 und 6 erfolgte jeweils ein Mediumwechsel, wobei man BrdU und DC wieder in den entsprechenden Konzentrationen zusetzte. Alle Ansätze wurden zeitgleich am Tag 8 geerntet, wodurch sich eine Expositionszeit der Zellen gegenüber BrdU/DC von 96 h bzw. 48 h ergab. War eine nicht mit BrdU behandelte Kontrollprobe notwendig, erfolgte die Aussaat ebenfalls am Tag 1 und die Ernte zeitgleich mit den mit BrdU inkubierten Zellen. Alle Proben mussten für die spätere Messung am Durchflusszytometer eingefroren werden. Dazu wurden diese nach der Ernte in Einfriermedium aufgenommen und nach gründlichem Mischen bei -20°C aufbewahrt.

Für die Färbung wurden 1 Mio aufgetaute Zellen einmal mit DNA-Puffer gewaschen und anschließend zur Permeabilisierung in 960 ml DNA-Puffer mit 0,1% Igepal als Detergenz

30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 1,2 µl Hoe einer Stammlösung von 1 mg/ml und 40 µl RNase A (Stammlösung 1 mg/ml, 50 - 100 Units/mg; Endkonz. 40 µg/ml, 2 - 4 Units/ml) zugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Es schloss sich die Zugabe von 1,5 µl PI (Stammlösung 1 mg/ml; Endkonz. 1,5 µg/ml) und eine 15-minütige Inkubationsphase an. Die Zellsuspension wurde durch einen Zellsieb filtriert und am FACStar<sup>PLUS</sup> bei einer Durchflussrate von weniger als 300 Ereignissen pro Sekunde gemessen.

#### 4.1.6 BrdU-Inkubation für die Bestimmung der G0-Phase Fraktion

Die G0-Phase Fraktion wurde mit Hilfe der BrdU/Hoechst-Quenching Technik bestimmt. Dazu erfolgte am Tag 1 die Aussaat von je 0,3 Mio Zellen von BT474 und SK-BR-3 in je zwei T25-Kulturflaschen in DMEM mit 5% FKS. Nach der Zugabe von 10 µg/ml Herceptin zu je einer Probe pro Zelllinie am Tag 3 wurde am Tag 4 sowohl zu den Herceptin-behandelten als auch zu den unbehandelten Zellen BrdU in den Konzentrationen von 60 µM (SK-BR-3) bzw. 30 µM (BT474) zusammen mit halb-äquimolaren Konzentrationen von DC zugegeben. Diese BrdU-Konzentrationen hatten sich in Vorversuchen als diejenigen herausgestellt, die für die jeweilige Zelllinie einen optimalen *Quenching*-Effekt ergaben. Einer 96-stündigen Inkubation mit BrdU und einem Mediumwechsel unter Ersetzen der entsprechenden Reagenzien folgte die Zellernte am Tag 8 und die Färbung entsprechend den Angaben für die BrdU/Hoechst-Quenching Technik unter 4.1.5.

#### 4.1.7 Zellpräparation für einparametrische DNA-Färbung

1 Mio geerntete Zellen wurden 2 × in PBS/ 0,01% NaN<sub>3</sub> gewaschen und in 1 ml kaltem, 70%-igem Methanol für mindestens 1 h bei 4°C fixiert. Anschließend waren zwei erneute Waschschritte in PBS/ 0,01% NaN<sub>3</sub> vorgesehen. Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei 37°C mit 425 µl PBS/ 0,01% NaN<sub>3</sub> und 50 µl RNase A (Stammlösung: 1 mg/ml, 50 - 100 Units/mg). Nach Zugabe von 25 µl PI aus einer 1 mg/ml Stammlösung (PI-Endkonz.: 50 µg/ml) und Mischen durch kurzes Vortexen konnten die Proben am FACSCalibur gemessen werden.

#### 4.1.8 Zellkultur und Zellpräparation für die Annexin-V-Färbung

Für die Untersuchung, ob BrdU bei BT474 Apoptose und/oder Nekrose induziert, wurden die Zellen mit dem TACS Annexin-V-FITC Kit von R&D Systems gefärbt. Annexin-V ist ein Ca<sup>2+</sup>-abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität zu dem Membranprotein Phosphatidylserin, das in der frühen Phase der Apoptose von der Membranninnenseite auf die Membranaußenseite gebracht wird (140).

Die Zellkultur wurde wie in 4.1.5 beschrieben durchgeführt. Die Negativkontrolle bildete ein Ansatz, für den keine BrdU-Behandlung erfolgte. Als Positivkontrolle wurden Zellen in einer Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen in einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit  $\text{NaN}_3$  in einer Endkonzentration von 180 mM behandelt, für 4 h inkubiert und anschließend geerntet (120). Die Annexin-V-Färbung erfolgte nach den Angaben des Herstellers des Annexin-V-FITC Kits:  $10^6$  geerntete Zellen waren  $2 \times$  mit  $\text{PAB}^2$  zu waschen (5 min, 1200 rpm) und das Pellet anschließend in 100  $\mu\text{l}$  Annexin-V Färbelösung (1  $\mu\text{l}$  Annexin-V-FITC in Bindungspuffer  $1\times$ ) zu resuspendieren. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurden 400  $\mu\text{l}$  Bindungspuffer  $1\times$  zugegeben. Die Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  von im Kit enthaltenem PI erfolgte 1 min vor der durchflusszytometrischen Analyse am FACSCalibur.

#### 4.1.9 Zellkultur und Zellpräparation für FRET-Analysen

Am Tag 1 der Zellkultivierung für FRET-Analysen erfolgte die Aussaat von je 0,5 Mio Zellen pro T75-Kulturgefäß in DMEM mit 5% FKS. Das Medium wurde am Tag 4 durch DMEM ohne FKS ersetzt. Nach 24 h Serumentzug erfolgte die Zugabe der Wachstumsfaktoren und/oder von Herceptin, wie für die Kurzzeitstimulation unter 4.1.2 beschrieben.

Nach der Ernte wurden die Zellen auf Eis transferiert und während der gesamten Färbung bei  $4^\circ\text{C}$  gehalten, um unerwünschte zellphysiologische Prozesse wie z. B. eine Rezeptor-Internalisierung zu verhindern. Alle Färbungen und Inkubationsschritte für Fluoreszenzmarkierungen wurden unter abgedunkelten Bedingungen durchgeführt. Dies sollte ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe verhindern (*Photobleaching*).

Die Zellen wurden unmittelbar nach der Ernte abzentrifugiert (5 min, 1200 rpm,  $4^\circ\text{C}$ ), zweimal in 2,5 ml kaltem  $\text{PAB}^5$  (PBS/ 0,01%  $\text{NaN}_3$ / 5% BSA) gewaschen und dabei in 5 ml Rundbodenröhrchen aufgeteilt. Pro Probe waren 20% der aus einer T75-Kulturflasche stammenden Zellen (0,4 Mio) vorgesehen. Nach Zentrifugation wurden die pelletierten Zellen in 40  $\mu\text{l}$  der vorbereiteten Antikörperversdünnungen (vgl. Tab. 6 - Tab. 8) resuspendiert. Die Inkubationszeit betrug für alle Färbeschritte 30 min, wobei die Proben im Abstand von 10 min durch vorsichtiges Vortexen bei niedriger Umdrehungszahl gemischt wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit schlossen sich stets zwei Waschschrirte mit jeweils 1 ml  $\text{PAB}^5$  an. Anschließend konnten die pelletierten, vom Überstand befreiten Zellen entweder wiederum in der für die jeweilige Probe vorgesehene Antikörperversdünnung bzw. dem Sekundärreagenz resuspendiert oder für die Messung vorbereitet werden.

Nach Abschluss der Färbungen wurden die Zellen in 200  $\mu\text{l}$  kaltem  $\text{PAB}^5$  resuspendiert und sofort am Durchflusszytometer FACSCalibur gemessen. Sollten die Zellen für eine spätere



Analyse aufbewahrt werden, wurde das Zellpellet in 100  $\mu$ l PAB<sup>5</sup> resuspendiert und die Zellen unter langsamem Zutropfen beim Vortexen mit 100  $\mu$ l 4%-igem Paraformaldehyd (pH 7,4) fixiert.

Von allen für die FRET-Analysen verwendeten Antikörpern wurden im Vorfeld Sättigungskurven erstellt, aus deren Verlauf die Antikörperkonzentrationen bestimmt werden konnten, die für eine vollständige Markierung aller antigenen Determinanten auf einer Zelle notwendig waren. Die auf diese Weise ermittelten Konzentrationen sind in Tab. 6 bis Tab. 8 angegeben.

- Färbeschema für die EGFR Homodimerisierung

Tab. 6 gibt die für die Energietransfer-Experimente zur EGFR Homodimerisierung verwendeten Antikörper, deren Endkonzentrationen in der Färbelösung und die Art und Anzahl der Proben an.

Probe		Zelllinie	Inkubationslösung	Endkonz. [ $\mu$ g/ml]	Behandlungsmodus			
					unstim	WF	WF/Herc	Herc
A	Autofluoreszenz	BT474 und SK-BR-3	PAB <sup>5</sup>	-	+	+	+	+
B	Donor-only	SK-BR-3	PE-EGFR	6	+	-	-	-
C	Akzeptor-only	SK-BR-3	Cy5-EGFR	20	+	-	-	-
D	FRET	BT474 und SK-BR-3	PE-EGFR	6	+	+	+	+
			Cy5-EGFR	40				

**Tab. 6:** Proben für die EGFR Homodimerisierung mit den Endkonzentrationen der verwendeten Antikörper. Von sowohl unstimulierten (unstim) als auch von Wachstumsfaktor (WF)- und/oder Herceptin (Herc)-stimulierten Zellen wurden je eine Autofluoreszenz-Probe (A) und eine FRET-Probe (D) hergestellt. Zusätzlich sind unstimulierte SK-BR-3 dazu verwendet worden, je eine Donor-only Probe mit PE (B) und eine Akzeptor-only Probe mit Cy5 (C) zu färben. Sowohl der PE- als auch der Cy5-markierte anti-EGFR Antikörper (PE-EGFR bzw. Cy5-EGFR) stammten vom Klon EGFR.1.

Für die Bestimmung der Farbstoff-spezifischen S-Faktoren und des  $\alpha$ -Faktors wurden unstimulierte SK-BR-3 Zellen verwendet und pro Versuchsansatz (vgl. Behandlungsmodus 1 bzw. 2 in 4.1.2) jeweils eine Donor-only Probe mit PE-markiertem und eine Akzeptor-only Probe mit Cy5-markiertem anti-EGFR Antikörper (PE- bzw. Cy5-EGFR) gefärbt (vgl. Tab. 3 und Tab. 6: Proben B bzw. C). Für sowohl unstimulierte Zellen als auch für mit Wachstumsfaktoren (WF) und/oder Herceptin (Herc) behandelte Zellen wurde des Weiteren je eine Autofluoreszenzprobe und eine FRET-Probe hergestellt (vgl. Tab. 3 und Tab. 6: Proben A bzw. D). Für die FRET-Probe wurde für den Akzeptor-Farbstoff die doppelte, zur Absättigung aller Bindungsstellen führende Konzentration verwendet, um unter Zugabe der einfachen Sättigungskonzentration an PE-markiertem EGFR-Antikörper ein PE/Cy5-Markierungsverhältnis der Rezeptoren von 1:2 zu erzielen. Um die Bindung von zwei Antikörpern an ein EGFR-

Molekül zu unterbinden und damit intramolekularen Energietransfer auszuschließen, fanden ausschließlich Antikörper des Klons EGFR.1 Verwendung.

- Färbeschema für die EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung

Die pro Behandlungsmodus (vgl. 4.1.2) für die Untersuchung der EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung hergestellten Proben und die genaue Reihenfolge der Färbeschritte sind in Tab. 7 aufgeführt. Außerdem sind die Konzentrationen der verwendeten Antikörper und Fab-Fragmente angegeben.

Mit Hilfe der Probe A1 wurde die Autofluoreszenz bestimmt. Für die Färbung der Donor-*only* bzw. Akzeptor-*only* Proben (B bzw. C) fanden Cy3- bzw. Cy5-markierte anti-c-erbB2 Antikörper des Klons 4D5 Verwendung (Cy3/Cy5-4D5). Pro Versuchsansatz wurden diese Proben jeweils nur für unstimulierte Zellen von BT474 und SK-BR-3 hergestellt.

Probe		Färbeschritt	Inkubations- lösung	Endkonz. [µg/ml]	Behandlungsmodus			
					unstim	WF	WF/Herc	Herc
A1	Autofluoreszenz	1	PAB <sup>5</sup>	-	+	+	+	+
A2	unspez. Bindung	1	Fab	20	+	+	+	+
		2	Cy3-Fab	20				
B	Donor- <i>only</i>	1	Cy3-4D5	40	+	-	-	-
C	Akzeptor- <i>only</i>	1	Cy5-4D5	40	+	-	-	-
D	FRET	1	Fab	20	+	+	+	+
		2	EGFR	10				
		3	Cy3-Fab	20				
		4	Cy5-2C4	40				

**Tab. 7: Proben für die EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung mit den Konzentrationen der verwendeten Antikörper und Fab-Fragmente.** Pro Stimulus und pro Zelllinie sind fünf Proben notwendig: A1: Autofluoreszenz-Probe, A2: Kontrollprobe zur unspezifischen Bindung der Cy3-markierten Fab-Fragmente (Cy3-Fab), B: Donor-*only* Probe, C: Akzeptor-*only* Probe, D: FRET-Probe. Als unmarkierter anti-EGFR Antikörper (EGFR) wurde der Klon EGFR.1 verwendet. Fluoreszenzfarbstoff-markierte anti-c-erbB2 Antikörper stammten vom Klon 4D5 (Cy3/Cy5-4D5) bzw. 2C4 (Cy5-2C4). Der Antikörper des Klons 2C4 bindet dabei nicht kompetitiv zu Herceptin an den c-erbB2 Rezeptor. WF: Wachstumsfaktor, Herc: Herceptin.

Da sich in Vorexperimenten herausstellte, dass die Cy3-Fab Fragmente eine geringe unspezifische Bindung an den monoklonalen Antikörper Herceptin in entsprechend behandelten Zellen zeigen, wurden die Bindungsstellen des Herceptin für die Fab-Fragmente in einem ersten Inkubationsschritt (vgl. Tab. 7: Färbeschritt 1 der Proben A2 und D) mit unmarkierten Fab-Fragmenten (Fab) abgesättigt. Die Probe A2 und die FRET-Probe D wurden dafür gemeinsam mit Fab-Fragmenten vorinkubiert und anschließend aufgeteilt. Die Probe A2 diente dabei für jedes Experiment als Kontrolle für eine erfolgreiche Absättigung der unspezifischen Bindung.

In der FRET-Probe wurde der EGF-Rezeptor mit unmarkierten anti-EGFR Antikörpern (Klon EGFR.1) in Kombination mit Cy3-markierten Fab-Fragmenten (Cy3-Fab) gefärbt. Die Fluoreszenzmarkierung des c-erbB2 Rezeptors erfolgte mit Cy5-markierten anti-c-erbB2 Antikörpern des Klons 2C4 (Cy5-2C4). Dieser Antikörper bindet nicht kompetitiv zu Herceptin an den c-erbB2 Rezeptor und kann somit mit Versuchen zur Analyse des Effekts von Herceptin auf die erbB-Rezeptor-Interaktion kombiniert werden.

- Färbeschema für die c-erbB2 Homodimerisierung

Tab. 8 enthält eine Auflistung der für die Energietransfer-Experimente zur c-erbB2 Homodimerisierung verwendeten Antikörper, deren Endkonzentrationen in der Färbelösung und der Art und Anzahl der Proben für die einzelnen Behandlungsmodi. In Analogie zum Färbeschema der EGFR Homodimerisierung wurden für jeden Stimulus eine Autofluoreszenz-Probe (Probe A) und eine FRET-Probe (Probe D) in einem Donor/Akzeptor-Verhältnis von 1:2 gefärbt. Für die FRET-Proben kamen Cy3- bzw. Cy5-markierte anti-c-erbB2 Antikörper des Klons 2C4 (Cy3/Cy5-2C4) zur Anwendung.

Um die Farbstoff-spezifischen S-Faktoren und den  $\alpha$ -Faktor bestimmen zu können, war unter Verwendung von unstimulierten Zellen für jede Zelllinie eine Färbung einer Donor-*only* und einer Akzeptor-*only* Probe mit Cy3- bzw. Cy5-markierten anti-c-erbB2 Antikörpern des Klons 4D5 vorgesehen (Tab. 8: Proben B und C).

Probe		Inkubations- lösung	Endkonz. [ $\mu$ g/ml]	Behandlungsmodus			
				unstim	WF	WF/Herc	Herc
A	Autofluoreszenz	PAB <sup>5</sup>	-	+	+	+	+
B	Donor- <i>only</i>	Cy3-4D5	40	+	-	-	-
C	Akzeptor- <i>only</i>	Cy5-4D5	40	+	-	-	-
D	FRET	Cy3-2C4	40	+	+	+	+
		Cy5-2C4	80				

Tab. 8: Es sind für die c-erbB2 Homodimerisierung die für jede Zelllinie hergestellten Proben bei den einzelnen Behandlungsmodi mit den Endkonzentrationen der verwendeten Antikörper aufgeführt. Von sowohl unstimulierten als auch von Wachstumsfaktor (WF)- und/oder Herceptin (Herc)-stimulierten Zellen (vgl. 4.1.2) wurden je eine Autofluoreszenz-Probe (A) und eine FRET-Probe (D) hergestellt. Zusätzlich sind unstimulierte Zellen von jeder Zelllinie dazu verwendet worden, um je eine Donor-*only* Probe mit Cy3 (B) und eine Akzeptor-*only* Probe mit Cy5 (C) zu färben. Die Cy3- bzw. Cy5-markierten anti-c-erbB2 Antikörper für die Proben B und C stammten vom Klon 4D5 (Cy3/Cy5-4D5), die für die Proben D vom Klon 2C4 (Cy3/Cy5-2C4). Der Antikörper des Klons 2C4 bindet nicht kompetitiv zu Herceptin an den c-erbB2 Rezeptor.

## 4.2 PROTEINCHEMISCHE/ IMMUNOLOGISCHE METHODEN

### 4.2.1 Gewinnung von denaturierten Zellextrakten

1 Mio Zellen wurden in T175-Kulturflaschen ausgesät und nach 7-tägigem Wachstum geerntet. Dazu erfolgten drei Waschschr tte mit kaltem PBS mit anschließender Zugabe von 300 µl Lysispuffer. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis zum Aufschließen der Zellmembran wurde das Lysat in ein 15 ml Röhrchen gegeben und zur Fragmentierung der genomischen DNA 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Nach überführen in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß war ein Zentrifugationsschritt von 5 min bei 12000 rpm und 4°C vorgesehen. Das Pellet wurde verworfen und vom Überstand die Proteinkonzentration bestimmt (vgl. 4.2.2). Nach Aufteilen des Zelllysats in Aliquots erfolgte deren Lagerung bei einer Temperatur von -80°C.

### 4.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Protein-Assay-Kit

Die Proteinbestimmung wurde mit dem BCA-Protein-Assay-Kit von Pierce durchgeführt. Die chemische Reaktion zur Quantifizierung der Proteine mit Hilfe dieses Kits beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  durch Proteine in alkalischem Medium (Biuret-Reaktion).

Für die Versuchsdurchführung wurden 10 µl der in TE-Puffer 1:10 verd nnnten Proteinlysate, der Proteinstandardl sung (25 - 2000 µg/ml BSA in TE-Puffer) und 10 µl einer Negativkontrolle (TE-Puffer) auf eine Mikrotiterplatte aufgebracht. Lösung A (Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninsäure und Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid) und Lösung B (4% Kupfersulfat) aus dem BCA-Protein-Assay-Kit mussten im Verhältnis 1:50 gemischt und davon je 200 µl zu jedem Well gegeben werden. Nach kurzem Mischen wurde 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit einem ELISA-Reader bei 540 nm die Absorption gegen die Referenz gemessen. Die Proteinkonzentration in den zu analysierenden Proben konnte anhand der Standard-Eichgerade berechnet werden.

### 4.2.3 Der „Sandwich“-ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay)

Die ELISA-Experimente wurden nach dem sog. „Sandwich“-Prinzip durchgeführt. Dazu wurden Mikrotiterplatten verwendet, die mit dem sog. „Fang-Antikörper“ beschichtet waren. An diesen Antikörper bindet bei einer Inkubation mit Zelllysat das darin enthaltene Antigen. Das gesuchte, immobilisierte Protein kann z. B. mit Hilfe von weiteren, entweder direkt gegen das Antigen gerichteten HRP (*Horseradish-Peroxidase*)-konjugierten Antikörpern oder durch eine Zweischnitt-Markierungstechnik (biotinylierter Primärantikörper in Kombination mit einem Streptavidin-HRP Konjugat) nachgewiesen werden. Die Menge an gebundenem HRP-

markierten Antikörper bzw. an Streptavidin-HRP ist der Menge an immobilisiertem Antigen proportional und wird über den Umsatz des Substrats quantifiziert. Nach der Entwicklung einer Farbreaktion kann die Absorption der Substratlösung bei 450 nm an einem ELISA-Reader gemessen werden.

- EGFR- und EGFR[pY1173]-ELISA

Die Untersuchung des Phosphorylierungsgrads des EGFR in Abhängigkeit von unterschiedlichen Stimuli erfolgte unter Verwendung der in den beiden ELISA-Kits *human full length* EGFR und *human* EGFR[pY1173] (Biosource) vorhandenen Lösungen und Antikörpern. Für die Versuchsdurchführung wurde in Anlehnung an die unterschiedliche EGFR-Expression der beiden untersuchten Zelllinien (vgl. Abb. 12) die Konzentration des Gesamtproteins in den Lysaten für SK-BR-3 auf 30 µg/ml und für BT474 auf 90 µg/ml in Assay-Puffer (PBS/ 0,01% NaN<sub>3</sub>/ 0,05% Tween 20/ 0,5% BSA) verdünnt und für jede Zelllinie und pro Stimulus (vgl. 4.1.2) je 100 µl in je vier Wells pipettiert. Zwei dieser Wells dienten in einer Doppelbestimmung zur Detektion des Gesamt-EGFR-Gehalts, in den beiden weiteren Wells wurde das Ausmaß der EGFR-Phosphorylierung bestimmt. Ebenfalls in einer Doppelbestimmung wurden 100 µl der Standardproteinlösungen (10 - 0,16 ng/ml EGFR bzw. 100 - 1,6 Units/ml EGFR[pY1173], beides verdünnt in Assay-Puffer) und ein Nullwert (100 µl Assay-Puffer) aufgetragen. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei RT der mit Folie abgedeckten Platten. Anschließend fanden vier Waschschrte mit je 400 µl Waschpuffer (PBS/ 0,01% NaN<sub>3</sub>/ 0,05% Tween 20) statt. Die Detektions-Antikörper (*anti-human* EGFR bzw. *anti-human* EGFR[pY1173]) wurden 1:100 in Assay-Puffer verdünnt und davon je 100 µl in die zugehörigen Wells gegeben. Nach einer Stunde bei RT waren erneut vier Waschschrte vorgesehen. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei RT mit je 100 µl einer 1:100 Verdünnung des HRP-konjugierten Entwickler-Antikörpers in Assay-Puffer musste wiederum viermal gewaschen werden. Anschließend wurden je Well 100 µl des im ELISA-Kit enthaltenen Chromogens (Tetramethylbenzidin) unverdünnt zugegeben, 25 min im Dunkeln und bei RT inkubiert und schließlich die Reaktion durch Zugabe der Stopplösung (1 M Phosphorsäure) abgebrochen. Die Messung der Farbintensität erfolgte innerhalb von einer Stunde bei 450 nm am ELISA-Reader gegen einen Nullwert, der sich durch die Zugabe von lediglich Chromogen und Stopplösung zu einem Well erstellt wurde.

- c-erbB2 und Phospho-c-erbB2 ELISA

Für die Bestimmung des Phosphorylierungsgrads von c-erbB2 kam der *human* sp185<sup>HER-2</sup>-ELISA Kit von Biosource zur Anwendung. Die Untersuchungen zum Gesamt-c-erbB2-Gehalt in den Proben erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers. Für den quantitativen Nachweis

des Phosphorylierungsgrads von c-erbB2 wurde die Detektion mit einem biotinylierten anti-Phosphotyrosin-Primärantikörper (PY20-biot.) in Kombination mit einem Streptavidin-HRP Konjugat für die Anwendung im *human* sp185<sup>HER-2</sup>-ELISA optimiert. Die verwendeten Mikrotiterplatten des *human* sp185<sup>HER-2</sup>-ELISAs waren mit einem anti-c-erbB2 Antikörper beschichtet, der den Rezeptor in der extrazellulären Domäne bindet, was somit eine Detektion der Phosphorylierung in der intrazellulären Domäne sterisch nicht blockiert. Der "Fang"-Antikörper und Herceptin verhalten sich in Bezug auf die Bindung an c-erbB2 nach Angaben des Herstellers ebenfalls nicht kompetitiv. Als Standard für die Analyse des Phosphorylierungsgrads von c-erbB2 wurde ein Zelllysats von Herceptin-stimulierten SK-BR-3 Zellen verwendet und in vier Schritten jeweils 1:2 verdünnt. Das Signal der unverdünnten Probe wurde als 100 Units/ml definiert.

Die zu untersuchenden Proben von drei unabhängig voneinander gewonnenen Zelllysaten wurden auf eine Gesamtproteinkonzentration von 250 µg/ml (für die Messung des Phosphorylierungsgrads) bzw. 14,3 µg/ml (für die Rezeptorquantifizierung) verdünnt und davon je 100 µl in ein Well gegeben. Zur Detektion des Gesamt-c-erbB2-Gehalts kam ein im *human* sp185<sup>HER-2</sup>-ELISA Kit enthaltener, direkt mit HRP konjugierter anti-c-erbB2 Antikörper zum Einsatz, vom dem pro Well 100 µl einer 1:100 Verdünnung in Assay-Puffer eingesetzt wurden. Als Inkubationszeit waren 2 h bei RT vorgesehen. Die Detektion von Phospho-c-erbB2 mit dem biotinylierten anti-Phosphotyrosin-Antikörper (Klon PY20) erfolgte in einem Volumen von 100 µl pro Well und einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml in Assay-Puffer. Nach einstündiger Inkubation und anschließendem Waschen wurden je 100 µl des Streptavidin-HRP Konjugats (Endkonz.: 50 ng/ml in Assay-Puffer) zugegeben, 20 min auf dem Schüttler inkubiert und die ELISA-Platte anschließend gewaschen. Die Entwicklung der Farbreaktion fand mit den im sp185<sup>HER-2</sup>-ELISA Kit enthaltenen Lösungen (Substratlösung 1: Tetramethylbenzidin, und Substratlösung 2: 0,02% gepufferter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung, 1:1 gemischt) statt. Nach 30-minütiger Inkubation erfolgte die Zugabe der Stopplösung und die Messung bei 450 nm am ELISA-Reader.

- Auswertung der ELISA-Daten

Für den *human* EGFR[pY1173]- und den *human full length* EGFR-ELISA wurden aus den doppelt bestimmten Proben von jeweils einem Zelllysats die Mittelwerte der Absorptionsmessung gebildet. Mit Hilfe der Standard-Eichkurven konnte die Phosphorylierung in Units/ml und der Gesamt-Rezeptorgehalt der Proben in ng/ml umgerechnet werden. Um das Ausmaß der Phosphorylierung pro Rezeptor zu erhalten, wurden diese beiden Werte dividiert, wodurch sich der Phosphorylierungsgrad pro Rezeptor

in Units/ng ergibt. Für die Quantifizierung der c-erbB2-Phosphorylierung pro Rezeptor erfolgte ebenfalls die Umrechnung der Messwerte der drei unabhängig gewonnenen Zelllysate mit den Standardeichgeraden in Units/ml bzw. in ng/ml. Nach Quotientenbildung ergaben sich die Werte für die Phosphorylierung pro Rezeptor.

#### 4.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot

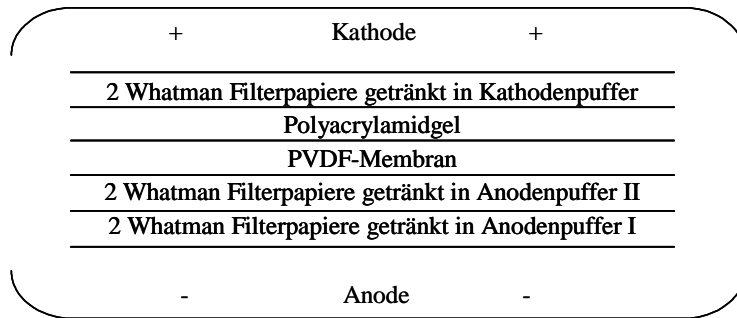
- Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht kam die von Laemmli beschriebene Methode zur Anwendung (66). Die Elektrophorese erfolgte mit vertikalen Minigelen (8 × 12 cm) in der Mini Protean 3 Elektrophorese-Einheit der Firma Biorad. Es wurden diskontinuierliche Gele benutzt, die aus Sammel (pH 6,8)- und Trenngel (pH 8,8) bestehen. Für das Sammel- bzw. das Trenngel waren Acrylamid-Konzentrationen von 4% bzw. 7,5% vorgesehen.

Die Gele wurden vor jeder Anwendung frisch gegossen. Dazu mussten Acrylamid-Lösung, Tris-HCl Puffer und H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gemischt und unmittelbar vor dem Gießen der Gele die restlichen Komponenten (vgl. 3.7) hinzugefügt werden. Nach der Polymerisation wurden die Gele in die Laufkammer eingebracht und mit 1× Laufpuffer überschichtet. Ein Probenvolumen entsprechend 15 µg Gesamtprotein wurde mit Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C gekocht, für 10 Sekunden bei 13000 rpm abzentrifugiert und zusammen mit dem Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Die Elektrophorese von gleichzeitig zwei Gelen erfolgte bei 80 V bis die Laufront die Grenze von Sammelgel zu Trenngel erreicht hatte. Anschließend wurde die Spannung auf 120 V erhöht und für 2 h und 40 min die Elektrophorese fortgeführt. Nach der SDS-PAGE wurde ein Western-Blot durchgeführt.

- Transfer aufgetrennter Proteine auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)

Der elektrophoretische Transfer der Proteine erfolgte mittels „Semi-Trocken-Blotting“ zwischen Elektrodenplatten in der *Fast-Blot*-Apparatur der Firma Biorad. Nach der Elektrophorese löste man das Gel von den Glasplatten ab und äquilibrierte es für 5 min in Anodenpuffer II. Die Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran wurde zuerst 10 min in Methanol und anschließend 10 min in Anodenpuffer II eingelegt. Pro Gel mussten je zwei Whatman Filterpapiere kurz mit Anodenpuffer I, Anodenpuffer II bzw. Kathodenpuffer befeuchtet werden. Anschließend wurden verschiedene Schichten auf die Anodenplatte der Blotting-Apparatur gelegt. Das folgende Schema beschreibt die Zusammensetzung des Western-Blots:



**Abb. 14:** Schematische Darstellung der Semi-Trocken-Blotting-Technik. Das Polyacrylamidgel und die PVDF-Membran wurden zwischen Whatman Filterpapiere - getränkt in Anodenpuffer I, II bzw. Kathodenpuffer - gelegt.

Der Aufbau wurde mit der Kathodenplatte bedeckt und für 1 h eine Stromstärke von  $1 \text{ mA/cm}^2$  angelegt. Dem Transfer auf die PVDF-Membran folgte der immunchemische Nachweis der membrangebundenen Proteine.

- Immunchemischer Nachweis von Proteinen durch Chemolumineszenz

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde diese zur Blockierung freier Bindungsstellen  $6 \times 20 \text{ min}$  bei RT in AP-T-Puffer/ 3% BSA leicht geschüttelt. Es folgte eine Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper (anti-c-erbB2-pY877:  $62,5 \text{ ng/ml}$ ; anti-c-erbB2-pY1112:  $206 \text{ ng/ml}$ ; anti-c-erbB2-pY1248:  $128 \text{ ng/ml}$ ; anti-c-erbB2:  $40 \text{ ng/ml}$ ) in AP-T-Puffer/ 3% BSA bei  $4^\circ\text{C}$  über Nacht. Am nächsten Morgen wurde zur Entfernung von überschüssigem, nicht gebundenem Antikörper die Membran  $6 \times 20 \text{ min}$  in AP-T-Puffer gewaschen und anschließend 1 h mit HRP-konjugiertem sekundären Antikörper ( $250 \text{ ng/ml}$ ) in AP-T-Puffer inkubiert. Ungebundener Sekundärantikörper musste wiederum durch Waschen ( $6 \times 20 \text{ min}$  in AP-T-Puffer) entfernt werden.

Nach Abschluss des letzten Waschschritts wurde die PVDF-Membran mit der Proteinseite nach oben auf eine saubere, durchsichtige Folie gelegt. Es folgte die Detektion der Antikörper/Antigen-Komplexe mit Hilfe des ECL (*enhanced chemoluminescence*)-Systems von Amersham. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase oxidiert dabei unter Katalyse von  $\text{H}_2\text{O}_2$  das zyklische Diacylhydrazin Luminol, was zur Freisetzung von Licht führt (Chemolumineszenz). Zum Start dieser Reaktion mussten  $1,95 \text{ ml}$  von Reagenz A und  $50 \mu\text{l}$  Reagenz B gemischt und auf die PVDF-Membran aufgetragen werden. Nach 2 Minuten wurde das Detektionsgemisch entfernt und die PVDF-Membran mit einer zweiten, durchsichtigen Folie luftblasenfrei abgedeckt. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm auf die trockene Folie gelegt, für einige Sekunden exponiert und der Film entwickelt.

Sollten auf einer Membran Proteine mit Antikörpern einer weiteren Spezifität detektiert werden, war zum Ablösen der membrangebundenen Primärantikörper ein 20-minütiger Waschschritt in  $0,1 \text{ mM}$  Glycin (pH 2,5) bei leichtem Schütteln vorgesehen. Anschließend



wurde mit AP-T-Puffer/ 3% BSA blockiert und - wie oben beschrieben - mit der Detektionsprozedur fortgefahren.

- Densitometrische Quantifizierung

Die Schwärzung der Banden auf dem Röntgenfilm kann mit einem Densitometer als optische Dichte (OD) gemessen werden. Die Auswertung der so gewonnenen Daten erfolgte mit dem Programm *Image Quant* V5.2 aus dem Programmpaket *IQ Solutions* V1.31 (Amersham). Dafür wurden die Banden der verschiedenen Spuren auf dem eingescannten Film durch gleich breite Bereiche eingegrenzt. Die Software summiert die auf gleicher Höhe relativ zum festgelegten Bereich gemessenen Intensitäten auf und stellt diese Werte als Peaks im Verlauf der Gelspur dar, deren Fläche sich mit Hilfe der Software berechnen lässt. Die so erhaltenen Werte für die Detektion des Phosphorylierungsgrads wurden auf die Werte der entsprechenden Banden für die Messung des Gesamt-Rezeptorgehalts bezogen und auf die Kontrolle normiert. Es ergibt sich dadurch der Stimulierungsindex für die unterschiedlichen Wachstumsfaktoren im Vergleich zur Kontrolle.

#### 4.3 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Für alle Untersuchungen wurden jeweils mindestens drei unabhängige Versuchsreihen durchgeführt. Die Daten sind als Mittelwerte mit ihren zugehörigen, in Excel berechneten Standardabweichungen angegeben. Unter Annahme der Normalverteilung wurde zum Vergleich zweier unabhängiger Gruppen ein zweiseitiger Student-*t*-Test angewandt. Das Signifikanzniveau wurde bei 5% festgelegt.

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 ZELLPROLIFERATION UND BRDU-SENSITIVITÄT

Die BrdU/Hoechst-Quenching und die anti-BrdU Technik sind zwei aussagekräftige Methoden, um die Zellzykluskinetik und die Zellproliferation zu untersuchen. Beide experimentelle Ansätze erlauben die Zuordnung individueller Zellen zu allen Zellzyklusphasen in sukzessiven Zellzyklen. Dabei zeichnet sich im Besonderen die BrdU/Hoechst-Quenching Technik durch die hohe Auflösung von bis zu drei aufeinander folgenden Zellzyklen in die einzelnen Phasen aus (vgl. 2.2.3). Beide Methoden basieren auf dem Einsatz von BrdU zur Markierung proliferierender Zellen, die dieses Nukleotidanalogen an Stelle von Thymidin in die DNA einbauen. Die Inkorporation von BrdU erfolgt entweder in einer Langzeitinkubation bis über mehrere Tage hinweg (BrdU/Hoechst-Quenching Technik) oder durch einen 30-minütigen BrdU-Puls (anti-BrdU Technik). Der Einbau von BrdU in die DNA kann jedoch bei sensiblen Zellen die Geschwindigkeit der Zellproliferation beeinflussen und somit eine Bestimmung der Zellzykluskinetik verfälschen. Um die beiden Zelllinien BT474 und SK-BR-3 auf einen potentiellen Effekt einer Inkorporation von BrdU hin zu analysieren, wurde sowohl für die Langzeitinkubation (vgl. 5.1.1) als auch für die Pulsmarkierung (vgl. 5.1.2) der Fortgang von BrdU-behandelten Zellen durch den Zellzyklus untersucht. Im Abschnitt 5.1.3 wird die anti-BrdU Technik zur Analyse der Wachstumsfaktor/Herceptin-abhängigen Zellproliferation verwendet. Anschließend wird in 5.1.4 der inhibitorische Effekt von Herceptin auf das Zellwachstum anhand der Quantifizierung der G0-Phase Zellen genauer analysiert.

#### 5.1.1 Effekt der Langzeitinkubation mit BrdU auf die Zellproliferation

- BrdU/Hoechst-Quenching Messung

Um den Einfluss einer Langzeitinkubation mit BrdU auf die Zellproliferation der Mammakarzinom-Zelllinien BT474 und SK-BR-3 hin zu untersuchen, wurden die Zellen für 48 h bzw. 96 h diesem Nucleotidanalogen in der für BrdU/Hoechst-Quenching Messungen gängigen Konzentration von 60  $\mu$ M ausgesetzt (Abb. 15 A - D) (61,62,63). Um einer Störung des Nukleotidstoffwechsels entgegenzuwirken, wurden außerdem 30  $\mu$ M DC in das Kulturmedium gegeben. Als Positiv- und Negativkontrollen fanden die Blasenkarzinom-Zelllinien RT4 (Abb. 15 E und F) und J82 (Abb. 15 G und H) Verwendung. Von der Zelllinie RT4 ist bekannt, dass sie auf die bifiläre Inkorporation von BrdU in die DNA mit einem

verlangsamten Zellzyklusfortgang reagiert, J82 Zellen hingegen zeigen eine vom BrdU-Einbau unbeeinflusste Proliferation (32).

In Abb. 15 ist in zweiparametrischen *Density*-Plots die Fluoreszenzintensität von PI (jeweils y-Achse) gegen Hoe (jeweils x-Achse) aufgetragen. Für die Teilabbildungen A, C, E und G wurden die Zellen einer 48-stündigen Inkubation mit BrdU ausgesetzt, die jeweils rechten Teilabbildungen (B, D, F und H) entstanden bei der Analyse von 96 h mit BrdU inkubierten Zellen.

Nach einer Inkubationszeit von 48 h mit BrdU ist der überwiegende Anteil von BT474 Zellen (67%) aus dem ersten Zellzyklus in die  $G1'_{G1}$ -Phase des zweiten Zellzyklus übergetreten (Abb. 15 A), aber erst zu 3% Prozent weiter in die  $S'_{G1}$ -Phase fortgeschritten. Der Anteil der S-Phase Fraktion (SPF) ist zu diesem Zeitpunkt durch die hohe Zahl an Zellen in  $S_{G1}$  transient erhöht, d. h. nach 96 h besteht die SPF nur mehr aus wenigen Zellen (Abb. 15 B, vgl. auch Abb. 16 und Abb. 17). Nach 96-stündiger BrdU-Inkubation finden sich bei BT474 auch nur mehr wenige Zellen in  $G1'_{G1}$  des zweiten Zellzyklus - der überwiegende Teil der Zellen liegt in der  $G1''_{G1'}$ -Phase des dritten Zellzyklus, die nur durch eine kleine Population von 4% der Zellen in die  $S''_{G1'}$ -Phase verlassen wird. Außerdem finden sich 2% der Zellen in  $G0/G1$  des ersten Zellzyklus und nehmen somit nicht an der Zellproliferation teil.

SK-BR-3 Zellen sind nach 48 h BrdU-Inkubation zu 78% in den zweiten und dritten Zellzyklus fortgeschritten (Abb. 15 C). 11% der Zellen befinden sich noch in  $G1_{G1}$  des ersten Zellzyklus. Nach 96 h (Abb. 15 D) hat sich die  $G1_{G1}/G1'_{G1}$ -Fraktion auf 2% verringert und es kommen 97% der Zellen im dritten Zellzyklus an, wobei ein Anteil von 93% in  $G1''_{G1'}$  aufläuft. Dieser hohe Wert für die Fraktion der G1-Phase Zellen drückt eine verlangsamte Proliferationsgeschwindigkeit aufgrund einer verlängerten G1-Phase aus. So zieht nach 96 h BrdU lediglich eine Spur von 3% der Zellen in die  $S''_{G1'}$ -Phase hinein.

Die als Positivkontrolle für BrdU-Sensitivität dienende Blasenkarzinom-Zelllinie RT4 ist sowohl 48 h als auch 96 h nach Start der BrdU-Exposition in die Zellzyklusphasen  $G1'_{G1}$  und  $G1''_{G1'}$  fortgeschritten (Abb. 15 E und F). Nach 48 h befinden sich 87% der Zellen in der  $G1'_{G1}$ -Phase des zweiten Zellzyklus. Diese Population kann als die Zellfraktion identifiziert werden, aus der sich eine Spur an Zellen in die  $S'_{G1}$ -Phase hinein bewegt. Ein kleiner Anteil an Zellen findet sich in der  $G1''_{G1'}$ -Phase unmittelbar neben den  $G1'_{G1}$ -Zellen des zweiten Zellzyklus. Nach 96 h BrdU-Inkubation sind mit 57% bzw. 28% die meisten RT4 Zellen in der  $G1'_{G1}$ -Phase des zweiten und in der  $G1''_{G1'}$ -Phase des dritten Zellzyklus akkumuliert. Dieser hohe Anteil an Zellen in der G1-Phase korreliert mit einer geringen SPF von 5% (vgl. Abb. 16).

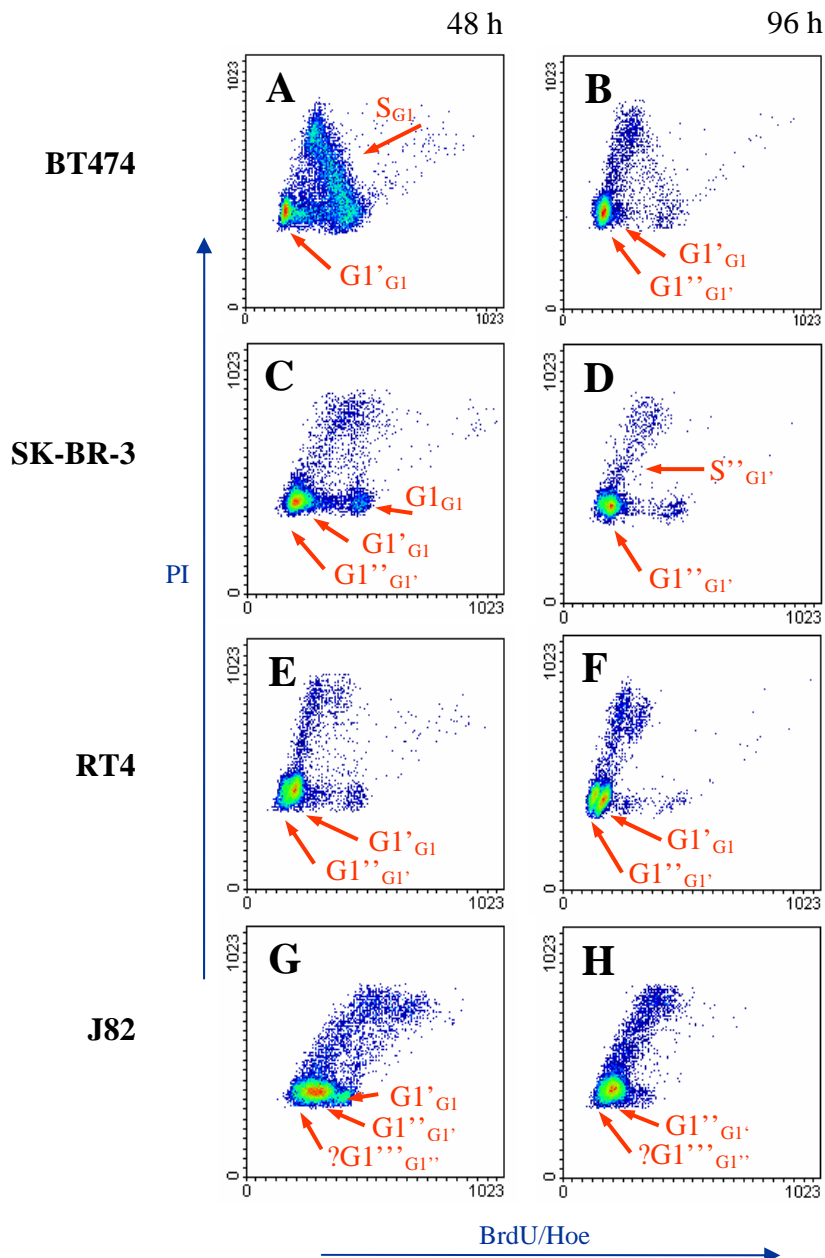


Abb. 15: BrdU/Hoechst-Quenching Messungen der Mammarkarzinom-Zelllinien BT474 (A und B) und SK-BR-3 (C und D) und der Blasenkarzinom-Zelllinien RT4 (E und F) und J82 (G und H). Es ist die PI-Fluoreszenz auf der y-Achse gegen die Fluoreszenzintensität von Hoe (x-Achse) in *Density-Plots* aufgetragen. Die Zellen wurden für 48 h (A, C, E und G) bzw. 96 h (B, D, F und H) mit BrdU und Desoxycytidin (DC) in den Konzentrationen von 60  $\mu$ M bzw. 30  $\mu$ M inkubiert. Das für jede Zelllinie charakteristische Verhalten auf diese Behandlung ist mit roten Pfeilen markiert und in Anlehnung an die Nomenklatur aus Abb. 9 beschriftet (27).

Die durch Endl (32) beschriebene, von BrdU unbeeinflusste Proliferation der J82 Blasenkarzinom-Zelllinie konnte durch die BrdU/Hoechst-Quenching Messungen in Abb. 15 G und H bestätigt werden. Nach 48 h haben alle Zellen den ersten Zellzyklus verlassen und sind in den zweiten und dritten Zellzyklus eingetreten. Aus den Zellpopulationen der G1-Phasen des zweiten ( $G1'_{G1}$ ) und des dritten Zellzyklus ( $G1''_{G1'}$ ) ziehen S-Phase Zellen in zwei parallelen Spuren hin zu höheren PI- und Hoe-Fluoreszenzintensitäten. Dabei liegen zum Zeitpunkt von 48 h 22% der Zellen im dritten Zellzyklus. Am 96-h Zeitpunkt haben die meisten Zellen den zweiten Zellzyklus verlassen, was den Anteil von Zellen in höheren Zellzyklen auf 96% ansteigen lässt (Abb. 15 H). Zellen in der  $G1'''_{G1''}$ -Phase können aufgrund einer Blase am linken Rand der G1-Populationen vermutet werden (vgl. Beschriftung in Abb. 15 G und H).

- Dosis-abhängiger Effekt der Langzeitinkubation mit BrdU

Anhand eines Vergleichs der SPF von unbehandelten Kontrollzellen mit Zellen, die verschiedenen BrdU-Konzentrationen ausgesetzt werden, kann ein potentieller dosis-abhängiger Effekt von BrdU untersucht werden. Dazu wurden BT474, SK-BR-3, RT4 und J82 jeweils für 48 h und 96 h den Konzentrationen von 3,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 60  $\mu\text{M}$  BrdU ausgesetzt. Zusätzlich wurde eine Kontrollprobe mitgeführt, die nicht mit BrdU behandelt wurde, aber für einen identischen Zeitraum wie die übrigen Zellen in Kultur blieb (vgl. 4.1.5). Von den geernteten Zellen wurde mittels einer PI-Färbung der DNA am Durchflusszytometer die einparametrische Zellzyklusverteilung gemessen und mit der Software WinCycle32 (vgl. 2.1.4) die SPF berechnet. Die Mittelwerte aus mindestens drei Messungen sind mit der jeweils zugehörigen Standardabweichung in Abb. 16 als Balkendiagramme dargestellt.

Für SK-BR-3 und RT4 zeigen die Werte für die SPF eine Dosisabhängigkeit: Die Anzahl der Zellen in der S-Phase sinkt bei steigenden Konzentrationen von BrdU sowohl bei 48- als auch bei 96-stündiger Inkubation mit dem Nucleotidanalogon. Zusätzlich ist sowohl bei SK-BR-3 als auch bei RT4 eine Abhängigkeit dieses BrdU-Effekts von der Inkubationszeit zu erkennen: Bei einem Vergleich zur Kontrollprobe sind für beide Zelllinien, bis auf den 48-h Zeitpunkt bei RT4, alle Werte für die SPF jeweils nach 96 h stärker erniedrigt als nach 48 h. Der mit Hilfe des Student-*t*-Tests ermittelte P-Wert liegt für SK-BR-3 bei einem Vergleich der Kontrolle mit den Proben, die mit 60  $\mu\text{M}$  bzw. mit 5  $\mu\text{M}$  BrdU behandelt wurden, bei 0,001. Auch bei BT474 bewirkt die Langzeitmarkierung mit BrdU eine Erniedrigung der SPF. Diese Verringerung zeigt jedoch nur eine Abhängigkeit von der Inkubationsdauer und ist nicht konzentrationsabhängig (Abb. 16). Die SPF bei BT474 bewegt sich nach 48 h BrdU, mit Ausnahme des Werts für 60  $\mu\text{M}$  BrdU, auf einem konstanten Level um 16%. Nach 96 h BrdU-Inkubation liegen die SPF-Werte mit 7,9% bis 10,4% ebenfalls im gleichen Bereich.

Auffallend bei BT474 ist der hohe Wert von 38,7% für die SPF bei 48-stündiger Behandlung mit 60  $\mu\text{M}$  BrdU. Die Erhöhung der SPF ist auch in Abb. 15 A mit der BrdU/Hoechst-Quenching Technik zu erkennen ( $S_{G1}$ -Zellen). Dieser Anstieg der Zahl der S-Phase Zellen ist jedoch nur transient, da bei gleicher BrdU-Konzentration nach 96 h die SPF wieder auf den sogar niedrigsten, für BT474 gemessenen Mittelwert von 7,9% absinkt.

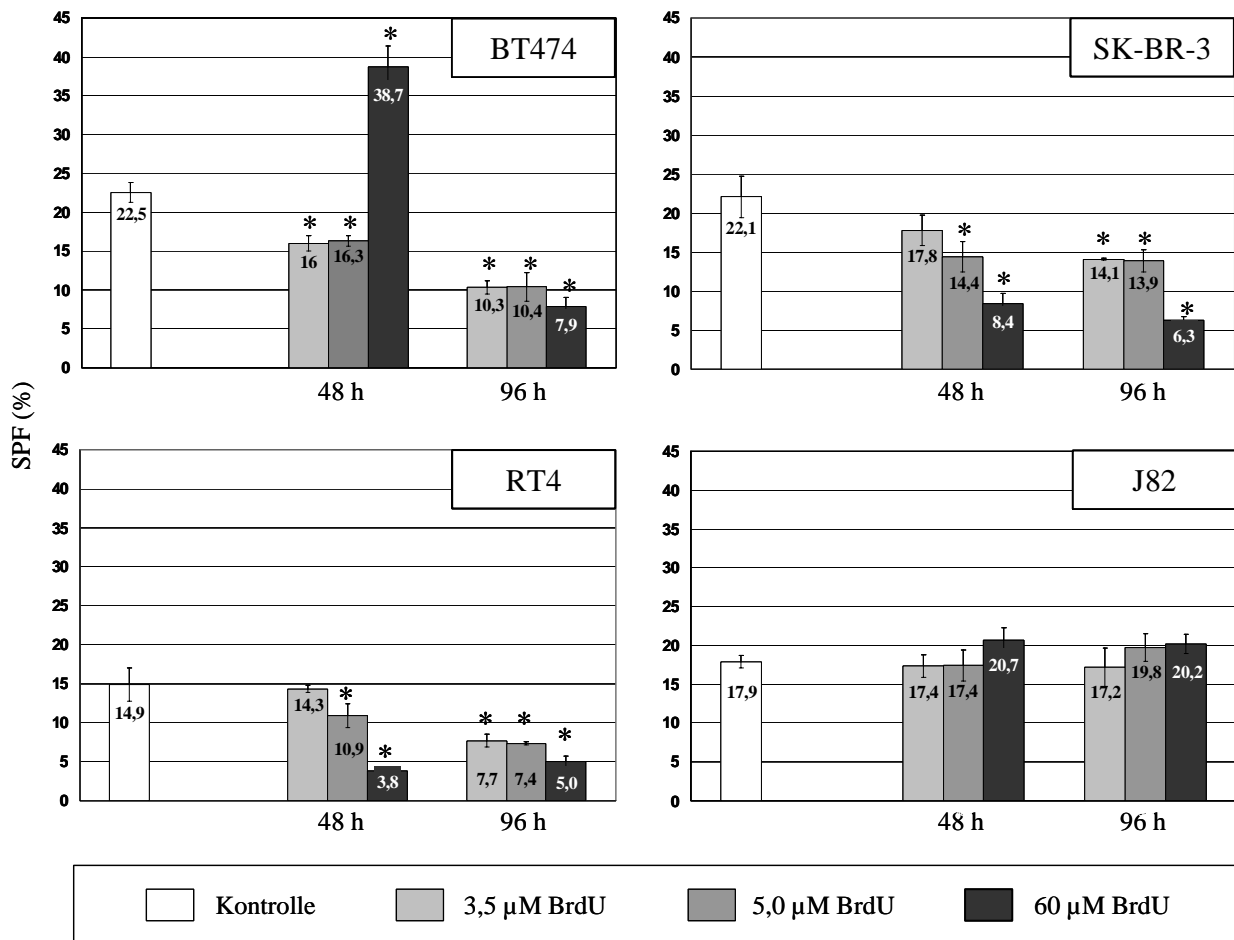
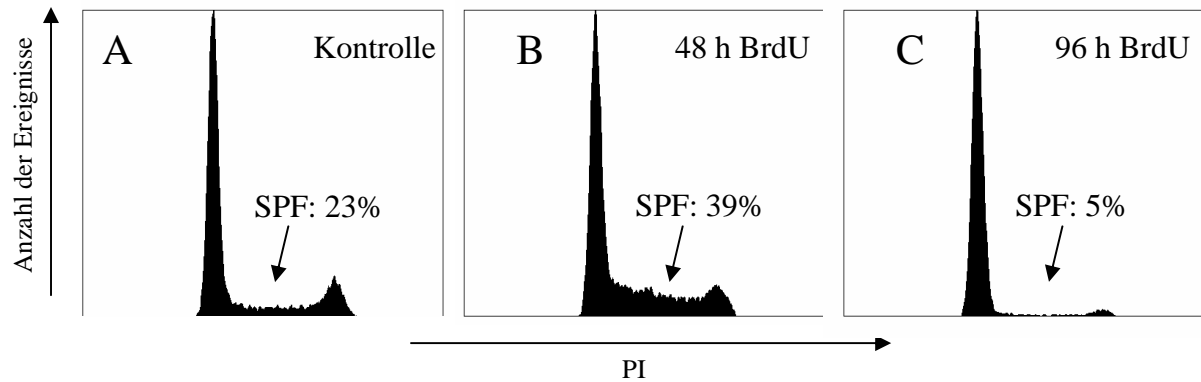


Abb. 16: S-Phase Fraktion (SPF) der Mammakarzinom-Zelllinien BT474 und SK-BR-3 und der Blasenkarzinom-Zelllinien RT4 und J82 nach Langzeitexposition (48 h und 96 h) mit BrdU in unterschiedlichen Konzentrationen (0, 3,5 µM, 5 µM und 60 µM BrdU). Nach einer PI-Färbung der DNA wurden durchflusszytometrisch einparametrische DNA-Histogramme gemessen und anschließend die SPF mit der Software WinCycle32 quantifiziert. Es sind die Mittelwerte ( $n = 3$ )  $\pm$  Standardabweichung gezeigt. Für den 48-h Wert bei 60 µM BrdU beträgt für BT474  $n = 8$ . Signifikante Änderungen im Vergleich zu unbehandelten Zellen sind mit \* markiert.

Die einparametrischen DNA-Histogramme von PI-gefärbten Zellen in Abb. 17 sollen diese Verhältnisse weiter verdeutlichen. Diese Abbildung zeigt in A eine Kontrollprobe von BT474 Zellen ohne BrdU-Zugabe zum Kulturmedium mit einer SPF von 23%. Die auf 5% reduzierte SPF von BT474 nach 96-stündiger BrdU-Inkubation bei einer Konzentration von 60 µM (Abb. 17 C) steht in Analogie zum Verhalten von SK-BR-3 und RT4 unter diesen Bedingungen, die ebenfalls mit einer Reduktion der Zahl an S-Phase Zellen auf die 96-stündige Inkubation mit 60 µM BrdU reagieren (vgl. Abb. 16). Ein repräsentatives DNA-Histogramm von BT474 nach 48 h mit 60 µM BrdU ist in Abb. 17 B dargestellt. Die SPF ist zu diesem Zeitpunkt mit 39% im Vergleich zur Kontrolle (23%) signifikant erhöht.



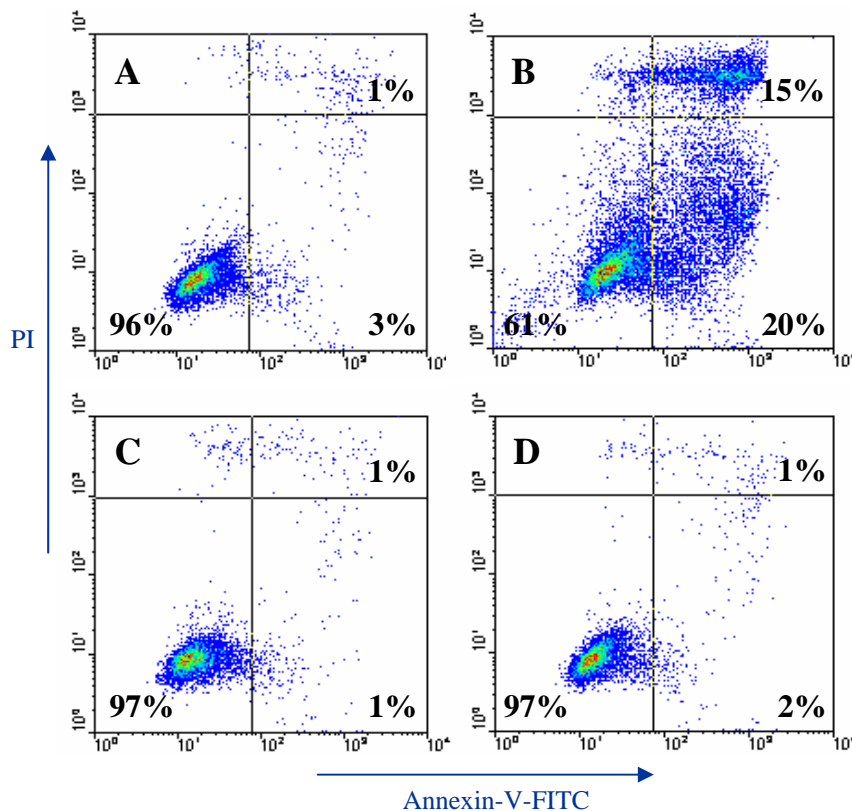
**Abb. 17:** Einparametrische DNA-Histogramme von PI-gefärbten BT474. Unbehandelte Zellen (A) zeigen eine SPF von 23%, die Proben mit 48- bzw. 96-stündiger BrdU-Inkubation (60  $\mu$ M) weisen eine SPF von 39% (B) bzw. 5% (C) auf. Die Zellen der drei Proben A, B und C befanden sich für identische Zeitintervalle in Kultur.

Im Gegensatz zu SK-BR-3, RT4 und BT474 bleibt die SPF von J82 unter allen getesteten BrdU-Konzentrationen und Inkubationszeiten unverändert und schwankt lediglich zwischen 17,2% und 20,7% (Abb. 16). Auch aus den BrdU/Hoechst-Quenching Messungen in Abb. 15 G und H lässt sich anhand der nach 48 h schon zum Teil und nach 96 h fast vollständig in den dritten Zellzyklus fortgeschrittenen Zellpopulation ablesen, dass J82 Zellen in ihrer Proliferation nicht durch eine Inkubation mit BrdU beeinflusst werden.

- Untersuchungen zur transient erhöhten SPF bei BT474 bei kontinuierlicher BrdU-Inkubation

Eine Erhöhung der SPF, wie sie bei BT474 nach 48-stündiger Inkubation mit 60  $\mu$ M BrdU zu beobachten ist (Abb. 15 A, Abb. 16 und Abb. 17 B), könnte daraus resultieren, dass G2M-Phase Zellen durch BrdU-induzierte Apoptose zugrunde gehen: Der DNA-Gehalt der apoptotischen Zellen könnte im Verlauf des kontrollierten Zelltods bzw. durch DNA- und Zellfragmentierung abnehmen, wodurch deren DNA-Gehalt in einer bestimmten Phase der Apoptose im Größenbereich von S-Phase Zellen liegen würde. Bei der Auftragung der Fluoreszenz von PI-gefärbten Zellen in einem Histogramm kann somit der Bereich, in dem S-Phase Zellen und apoptotische Zellen aus der G2M-Phase zu liegen kommen, deckungsgleich sein. Um diese Möglichkeit als Ursache für die transient erhöhte SPF bei BT474 zu untersuchen und um eventuelle apoptotische Zellen zu identifizieren, wurden Annexin-V/PI Färbungen durchgeführt und durchflusszytometrisch analysiert. In Abb. 18 ist in einzelnen *Density*-Plots die Fluoreszenzintensität von PI (y-Achse) gegen diejenige von Annexin-V-FITC (x-Achse) aufgetragen. Jede Einzelabbildung ist dabei in vier Quadranten unterteilt. Vitale Zellen sind sowohl PI- als auch FITC-negativ und erscheinen im unteren linken Quadranten. Zellen, die sich in einem frühen Stadium der Apoptose befinden, schaffen

Phosphatidylserin, zu dem Annexin-V eine hohe Affinität aufweist, von der Membraninnen- auf die Membranaußenseite (vgl. 4.1.8) (140). In der frühen Apoptose sind Zellen somit PI-negativ und Annexin-V-FITC-positiv, d. h. sie kommen im Quadranten rechts unten zu liegen. Zellen der späten Apoptose und der Nekrose zeichnen sich zusätzlich dadurch aus, dass die Membran permeabel für PI wird. Dadurch sind diese Zellen durch PI- und FITC-Positivität charakterisiert und platzieren sich im oberen rechten Quadranten.



**Abb. 18:** Durchflusszytometrische Analyse der Apoptose bei BT474 mit Annexin-V/PI Messungen. Es ist die Fluoreszenzintensität von PI (y-Achse) gegen die von Annexin-V-FITC (x-Achse) aufgetragen. Vitale Zellen erscheinen im Quadranten links unten. Frühe apoptotische Zellen finden sich im rechten unteren Quadranten. Rechts oben liegen die Zellen der späten Apoptose und der Nekrose. Der Anteil an apoptotischen Zellen beträgt bei unbehandelten Zellen 4% (A) und bei der Positivkontrolle 35% (für 4 h mit 180 mM NaN<sub>3</sub> behandelte BT474) (B). Die Inkubation mit 60 μM BrdU für 48 h (C) und für 96 h (D) führt zu einem Anteil von zwei bzw. drei Prozent Annexin-V-positiver Zellen (A).

Abb. 18 A zeigt für unbehandelte Zellen als Summe aus früher (unterer rechter Quadrant) und später Apoptose/Nekrose (oberer rechter Quadrant) einen Prozentsatz von 4% an toten Zellen. Als Positivkontrolle für Apoptose dienten für 4 h mit 180 mM NaN<sub>3</sub> inkubierte BT474 Zellen (Abb. 18 B). Diese Behandlung hat einen Anstieg des Anteils an Annexin-V-positiven Zellen auf 35% zur Folge, davon sind 20% der Zellen in der frühen Apoptose, 15% in der späten Apoptose bzw. Nekrose. Für 48 h BrdU (C) und für 96 h BrdU (D) hingegen bewegt sich die Fraktion von Annexin-V-positiven Zellen mit 2% bzw. 3% im Bereich der unbehandelten BT474 Zellen (A). Mit BrdU inkubierte BT474 zeigen somit im Vergleich zur Kontrolle weder nach 48- noch nach 96-stündiger BrdU-Exposition eine signifikante Erhöhung des Anteils an apoptotischen Zellen.



### 5.1.2 Effekt einer Pulsmarkierung mit BrdU auf die Zellproliferation

Um die Zellproliferation von BT474 und SK-BR-3 auf eine potentielle Störung durch BrdU nach einer Pulsmarkierung im Vergleich zu dessen kontinuierlicher Applikation und zu unbehandelten Zellen hin zu untersuchen, wurden Zellen wie für die anti-BrdU Technik unter 4.1.4 beschrieben behandelt. Als Positivkontrolle für eine Beeinflussung der Zellproliferation durch BrdU wurden kontinuierlich mit BrdU inkubierte Proben parallel mitgeführt. Für alle Proben erfolgte eine Bestimmung der Zellzahl und anhand einer PI-Färbung des DNA-Gehalts die Berechnung der SPF.

In Tab. 9 ist die Zellzahl von BT474 und SK-BR-3 in einer T25-Kulturflasche 24 h, 48 h und 96 h nach BrdU-Pulsmarkierung bzw. nach BrdU-Zugabe bei kontinuierlicher Exposition im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen aufgeführt. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte finden sich signifikante Unterschiede in den Zellzahlen der Kontrolle im Vergleich zu BrdU-pulsmarkierten BT474 bzw. SK-BR-3. D. h., dass im für die anti-BrdU Technik nach dem BrdU-Puls notwendigen Inkubationszeitraum von 34 h für BT474 und 38 h für SK-BR-3 (vgl. Abb. 20) und darüber hinaus beide Zelllinien nach BrdU-Pulsmarkierung im Vergleich zur Kontrolle eine identische und damit von der Inkorporation des BrdU unbeeinflusste Verdoppelungsrate aufweisen. Eine kontinuierliche Exposition mit BrdU jedoch führt nach 96 h bei BT474 und SK-BR-3 zu einer signifikant geringeren Zellzahl relativ zu den Kontrollproben.

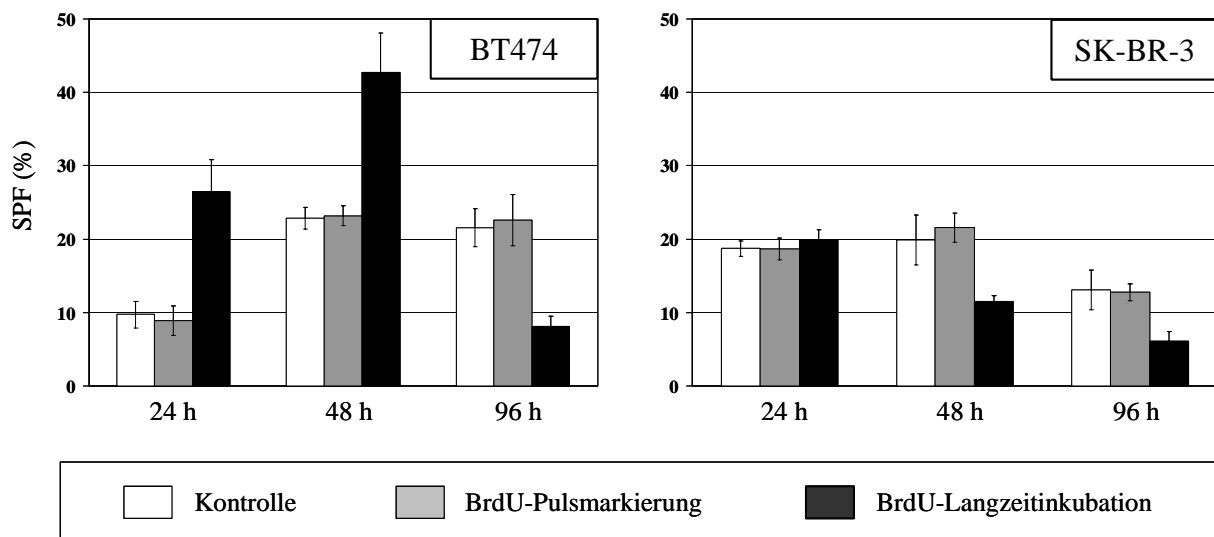
	Inkubation nach BrdU-Zugabe	Kontrolle	BrdU-Pulsmarkierung	BrdU-Langzeitinkubation
BT474	24 h	$6,5 \pm 0,8$	$6,9 \pm 1$	$6,6 \pm 0,9$
	48 h	$8,2 \pm 0,8$	$8,6 \pm 0,7$	$8,9 \pm 0,5$
	96 h	$14 \pm 1,7$	$14,2 \pm 0,8$	$12,4 \pm 0,4^*$
SK-BR-3	24 h	$6,5 \pm 1,4$	$7 \pm 1,4$	$7 \pm 0,9$
	48 h	$7,9 \pm 1,4$	$8,1 \pm 1,1$	$7,3 \pm 1,2$
	96 h	$15,5 \pm 0,8$	$16,1 \pm 0,7$	$10,3 \pm 0,6^*$

**Tab. 9:** Zellzahlen von BT474 und SK-BR-3 in 10<sup>5</sup>/T25-Kulturflasche 24 h, 48 h und 96 h nach BrdU-Pulsmarkierung bzw. mit BrdU-Langzeitinkubation im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Signifikante Änderungen im Vergleich zur unbehandelten Situation sind mit \* markiert.

In Abb. 19 ist die SPF von BT474 und SK-BR-3 zu den identischen Zeitpunkten wie für Tab. 9 dargestellt. Bei 24-, 48- und 96-stündiger Inkubation ergibt sich für unbehandelte im Vergleich zu BrdU-pulsmarkierten Zellen bei BT474 und SK-BR-3 eine im gleichen Bereich liegende SPF. Auch bei kontinuierlicher Exposition ist 24 h nach BrdU-Zugabe kein signifikanter Unterschied in der SPF zwischen SK-BR-3 Zellen nach BrdU-Langzeitinkubation und der unbehandelten Probe zu erkennen. In Analogie zu Abb. 16 zeigt hingegen die

Zelllinie BT474 nach 48-stündiger kontinuierlicher Inkubation mit BrdU eine Erhöhung der SPF auf 42,8%. Abb. 19 macht deutlich, dass sich diese Vergrößerung der Zahl von S-Phase Zellen bereits zum 24-h Zeitpunkt manifestiert. Bei SK-BR-3 hingegen verringert sich die SPF nach 48-stündiger Inkubation mit BrdU von 20,0% bei unbehandelten Zellen auf 11,6% bei kontinuierlicher BrdU-Exposition. Zum 96-h Zeitpunkt ist in Übereinstimmung mit Abb. 16 sowohl bei BT474 als auch bei SK-BR-3 eine im Vergleich zu Kontrollzellen (21,5% bzw. 13,0%) verringerte SPF von 8,1% bzw. 6,1% zu messen.

Sowohl die Bestimmung der Zellzahlen als auch die Berechnungen zur SPF zeigen, dass im Gegensatz zur BrdU-Langzeitinkubation eine Pulsmarkierung mit BrdU weder BT474 noch SK-BR-3 in ihrer Zellproliferation beeinflusst.



**Abb. 19:** SPF von PI-gefärbten BT474 und SK-BR-3 nach BrdU-Pulsmarkierung im Vergleich zu je einer unbehandelten Kontrolle und Proben nach BrdU-Langzeitinkubation, gemessen zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 96 h nach Zugabe von BrdU. Signifikante Änderungen im Vergleich zur unbehandelten Situation sind mit \* markiert.

### 5.1.3 Wachstumsfaktor- und Herceptin-abhängige Zellproliferation

Da die Langzeitinkubation mit BrdU bei der BrdU/Hoechst-Quenching Methode die Zellzykluskinetik von BT474 und SK-BR-3 beeinflusst (vgl. 5.1.1), ein 30-minütiger BrdU-Puls, wie er für die anti-BrdU Methode angewendet wird, jedoch keinen Effekt auf die Proliferation der beiden Zelllinien zeigt (vgl. 5.1.2), wurde die anti-BrdU Methode dazu verwendet, um den Einfluss von Herceptin, der Wachstumsfaktoren EGF und HRG und von deren kombinierter Applikation auf die Geschwindigkeit der Zellproliferation zu untersuchen. Dazu wurden die Zellen mit FITC-konjugierten Sekundärantikörpern gegen anti-BrdU Antikörper markiert (y-Achse) und diese Fluoreszenz gegen den mit PI gefärbten DNA-Gehalt (x-Achse) aufgetragen (Abb. 20).

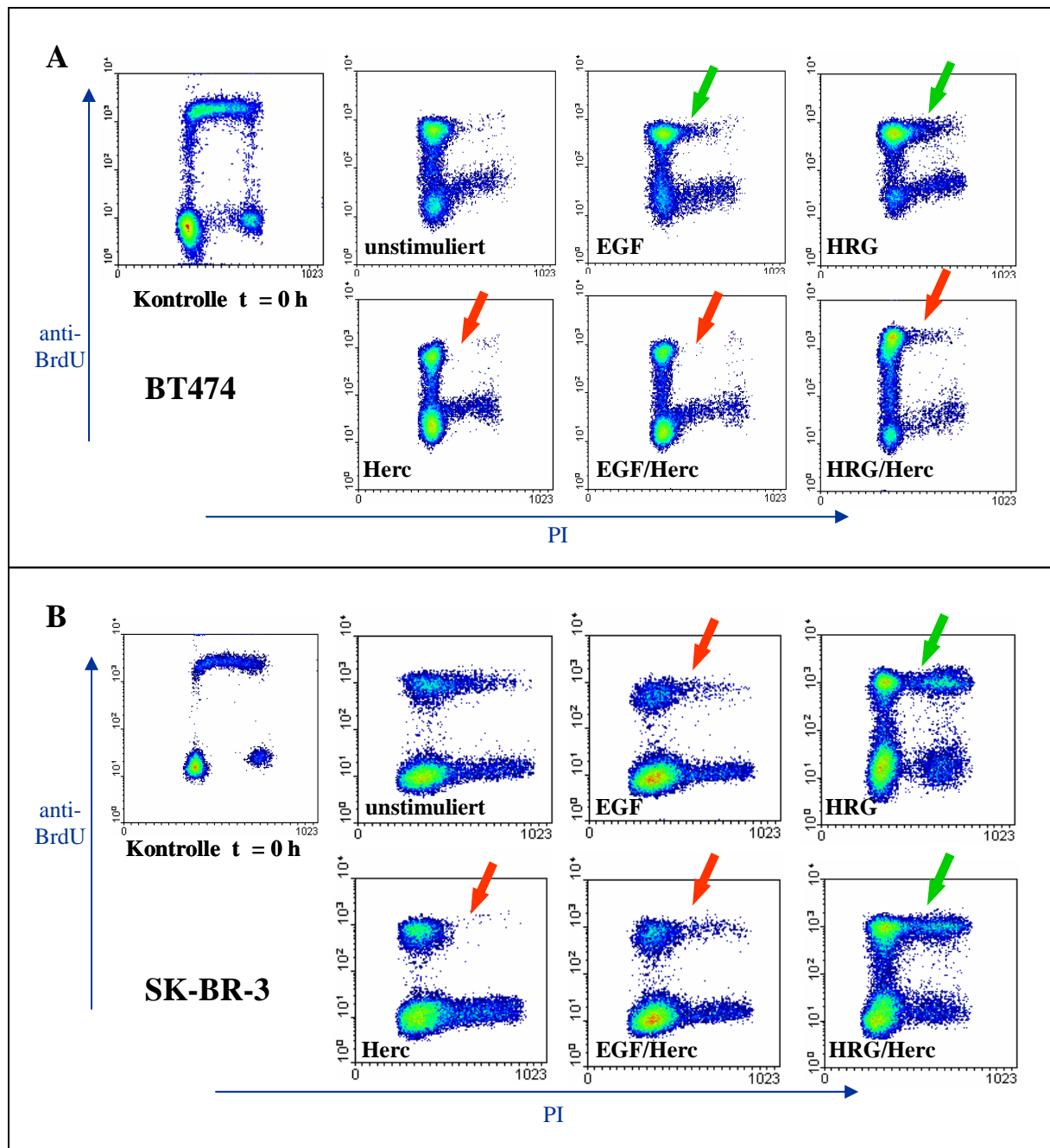


Abb. 20: Zellzykluskinetik von BT474 (A) und SK-BR-3 (B). Der Einbau von BrdU wurde durchflusszytometrisch mit Hilfe von FITC-markierten Sekundärantikörpern gegen anti-BrdU Antikörper nachgewiesen (y-Achse) und gegen eine PI-Färbung des DNA-Gehalts (x-Achse) in einem zweidimensionalen *Density*-Plot aufgetragen. Für jede Zelllinie ist ein Kontrollzeitpunkt  $t = 0$  h abgebildet, der die Zellzyklusverteilung unmittelbar nach dem BrdU-Puls darstellt. Die Zellen wurden mit den Wachstumsfaktoren EGF und HRG und mit Herceptin (Here) jeweils einzeln und in Kombination behandelt und 34 h (BT474) bzw. 38 h (SK-BR-3) nach dem BrdU-Puls geerntet und gefärbt. Eine im Vergleich zu unstimulierten Zellen beschleunigte Proliferation ist mit einem grünen Pfeil auf die Kohorte von BrdU-positiven S-Phase Zellen des zweiten Zellzyklus markiert. Eine verlangsamte Proliferation wird mit einem roten Pfeil hervorgehoben.

Für beide Zelllinien wurde der passende Zeitpunkt nach dem BrdU-Puls ermittelt, zu dem alle Zellen die Proliferation bis zur G1-Phase des zweiten Zellzyklus fortgesetzt hatten und im

Begriff waren, in die darauf folgende S-Phase einzutreten (BT474: 34 h, SK-BR-3: 38 h). Ein Vergleich dieses Fortschreitens der BrdU-positiven Zellen in die S-Phase unter den verschiedenen Behandlungsmodi und bei unstimulierten Zellen ermöglicht es, Aussagen über einen Wachstumsfaktor/Herceptin-vermittelten Effekt auf die Geschwindigkeit der Zellproliferation zu treffen. Ein im Vergleich zur unstimulierten Situation beschleunigtes Durchschreiten des Zellzyklus ist in den einzelnen Teilbildern von Abb. 20 mit einem grünen Pfeil auf die BrdU-positiven S-Phase Zellen hervorgehoben, eine verlangsamte Proliferation ist durch einen roten Pfeil markiert.

Zum Zeitpunkt  $t = 0$  h, d. h. direkt nach dem BrdU-Puls, ergibt sich für BT474 und SK-BR-3 die typische Hufeisenform in der Verteilung von BrdU-negativen G1- und G2M-Phase Zellen und BrdU-positiven Zellen der S-Phase (Abb. 20, vgl. hierzu auch Abb. 8 A und C). 34 h nach dem BrdU-Puls zeigt sich bei der Zelllinie BT474 (Abb. 20 A) bei Anwesenheit der Wachstumsfaktoren EGF oder HRG im Vergleich zu unstimulierten Zellen eine größere Fraktion an Zellen, die schon in die S-Phase des zweiten Zellzyklus eingetreten sind. Sowohl EGF als auch HRG wirken somit stimulierend auf die Proliferation von BT474 ein. Im Vergleich der beiden Wachstumsfaktoren untereinander wird bei HRG-Stimulation relativ zur Behandlung mit EGF die größere Fraktion an BrdU-positiven S-Phase Zellen deutlich, wodurch sich HRG im Vergleich zu EGF als effektiverer Stimulus für die Zellproliferation von BT474 darstellt. Wird zum Kulturmedium entweder EGF in Kombination mit Herceptin oder nur Herceptin gegeben, so fehlen nach 34 h noch jegliche, in die S-Phase des zweiten Zellzyklus fortgeschrittene Zellen. Herceptin vermittelt somit eine Retardation in der Zellproliferation. EGF kann diesen inhibitorischen Effekt von Herceptin nicht kompensieren. Im Gegensatz dazu kommt es mit HRG zu einer Attenuation der anti-proliferativen Wirkung von Herceptin auf BT474. Bei der Kombination HRG/Herceptin zeigt sich zum 34-h Zeitpunkt im Vergleich zur unstimulierten Situation immer noch eine größere Kohorte an Zellen in der S-Phase des zweiten Zellzyklus, was relativ zu unstimulierten Zellen eine immer noch leicht beschleunigte Wachstumsgeschwindigkeit ausdrückt.

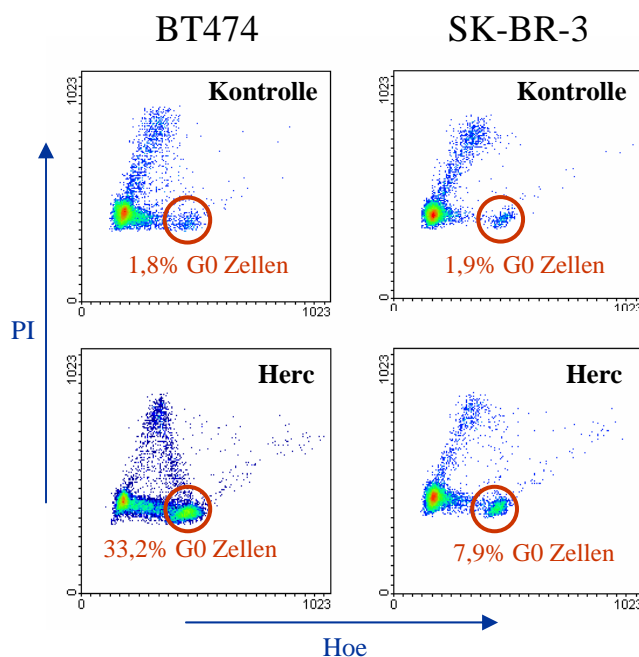
Im Gegensatz zu BT474 übt EGF in der eingesetzten Konzentration von 5 nM auf die Zellproliferation von SK-BR-3 einen inhibitorischen Einfluss aus (Abb. 20 B). Ein roter Pfeil in der entsprechenden Teilabbildung markiert hierfür die geringere Anzahl von Zellen in der S-Phase des zweiten Zellzyklus im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Bei Inkubation mit HRG sind jedoch zum 38-h Zeitpunkt auch bei SK-BR-3 eine größere Zellfraktion als bei der unbehandelten Kontrollprobe in der S-Phase angelangt. Somit stellt HRG sowohl bei SK-BR-3 als auch bei BT474 einen äußerst potenten Stimulus dar. Ebenso wie bei BT474

finden sich zum untersuchten Zeitpunkt auch bei SK-BR-3 bei alleiniger Applikation von Herceptin noch keine Zellen in der S-Phase des zweiten Zellzyklus. Herceptin ist damit für beide Zelllinien ein potenter Inhibitor der Proliferation. In Gegenwart von EGF ist mit Herceptin kein zusätzlicher inhibitorischer Effekt zu erkennen. In Kombination mit Herceptin kann HRG die anti-proliferative Wirkung von Herceptin vollständig aufheben, d. h. in den anti-BrdU Messungen ist kein Unterschied der mit HRG/Herceptin behandelten Zellen im Vergleich zur HRG-Stimulation zu erkennen.

#### 5.1.4 Herceptin-induzierter Exit aus dem Zellzyklus

In einem Vergleich der beiden Mammakarzinom-Zelllinien BT474 und SK-BR-3 wurde das Potential von Herceptin, auf die Zellproliferation inhibitorisch zu wirken, näher untersucht (Abb. 21). Dazu wurde mit Hilfe der BrdU/Hoechst-Quenching Technik die Zellfraktion bestimmt, die durch eine Inkubation mit Herceptin in die Ruhephase G0 übertritt. Für die Quantifizierung der G0-Phase Zellen wurde jeweils eine Probe jeder Zelllinie vor der BrdU-Zugabe zum Medium mit Herceptin vorinkubiert. Eine zweite Probe blieb Herceptin-frei, wurde jedoch in identischer Weise mit BrdU markiert. Bei einem Vergleich dieser beiden BrdU-positiven Proben kann die Zellfraktion quantifiziert werden, die aufgrund des Einflusses von Herceptin den Zellzyklus verlassen hat.

Die BrdU/Hoechst-Quenching Messungen zur Bestimmung der G0-Phase Zellen sind in Abb. 21 dargestellt. Die Position der ruhenden G0-Zellen ist dabei in jeder Teilabbildung mit einem roten Kreis markiert.



**Abb. 21:** BrdU/Hoechst-Quenching Messung von G0-Phase Zellen von BT474 und SK-BR-3. Auf der y-Achse ist die PI-Fluoreszenz, auf der x-Achse die Hoe-Fluoreszenz aufgetragen. Die G0-Phase Zellen sind mit einem roten Kreis markiert. Diese Zellfraktion proliferiert nicht, d. h. sie nimmt nicht aktiv am Zellzyklus teil. Ohne Herceptin-Behandlung finden sich bei BT474 1,8% und bei SK-BR-3 1,9% G0-Zellen. Werden die Zellen mit Herceptin (Herc) behandelt, steigt die G0-Phase Fraktion bei BT474 auf 33,2% und bei SK-BR-3 auf 7,9%.

Die Quantifizierung der G0-Phase Zellen ergibt sowohl bei der SK-BR-3 Kontrollprobe ohne Herceptin als auch bei der entsprechenden Probe von BT474 mit 1,9% bzw. 1,8% einen geringen Anteil an ruhenden Zellen. Mit Herceptin-Behandlung erhöht sich dieser Prozentsatz bei SK-BR-3 auf 7,9%. Bei der Zelllinie BT474 bewirkt Herceptin jedoch bei einem höheren Prozentsatz der Zellen einen Austritt aus dem Zellzyklus. Bei Behandlung von BT474 Zellen mit Herceptin steigt die Fraktion an G0-Phase Zellen auf 33,2% und hat damit im Vergleich zu SK-BR-3 einen vierfach stärkeren Effekt.

## 5.2 EGFR- UND C-ERBB2-AKTIVIERUNG/PHOSPHORYLIERUNG

Liganden-vermittelte Stimuli werden nach lateraler erbB-Rezeptor-Interaktion durch Transphosphorylierung von Tyrosinresten im zytoplasmatischen Abschnitt des Dimerisierungspartners an intrazelluläre Signalkaskaden weitergeleitet (vgl. 1.1). Sowohl der EGFR als auch c-erbB2 besitzen in ihrem C-terminalen Abschnitt mehrere Tyrosinreste mit unterschiedlicher Sequenzumgebung, die in Abhängigkeit des Liganden und des erbB-Dimerisierungspartners ein unterschiedliches Phosphorylierungsmuster aufweisen können (55). Jedes dieser Phosphotyrosine bindet bestimmte nachgeschaltete Adaptor- und Signalproteine, die mit unterschiedlichem Potential und Effektivität intrazelluläre Signalkaskaden anschalten und damit zu verschiedenen Effekten auf eine Zelle führen (vgl. 1.1.2) (43,94,95).

Um die Relevanz der einzelnen Phosphorylierungsstellen bei der Wachstumsfaktor/Herceptin-induzierten Signaltransduktion zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung des Tyrosinrests 1173 des EGFR durch die sehr sensitive ELISA-Technik (vgl. 5.2.1) untersucht, die im Gegensatz zur Methode des Western-Blotting auch bei Expressionsdichten von ca.  $7,6 \times 10^4$  EGF-Rezeptoren pro Zelle (11) reproduzierbare Ergebnisse erbrachte. Die Phosphorylierung des von beiden untersuchten Zelllinien überexprimierten c-erbB2 (ca.  $7 \times 10^5$  Rezeptoren pro Zelle, vgl. Abb. 12) (11) wurde im ELISA zunächst auf die gesamte Tyrosin-Phosphorylierung hin untersucht (vgl. 5.2.1), um anschließend mit SDS-PAGE und der Western-Blot Technik dessen Tyrosin-spezifische Phosphorylierung zu analysieren (vgl. 5.2.2).

### 5.2.1 EGFR und c-erbB2 ELISA

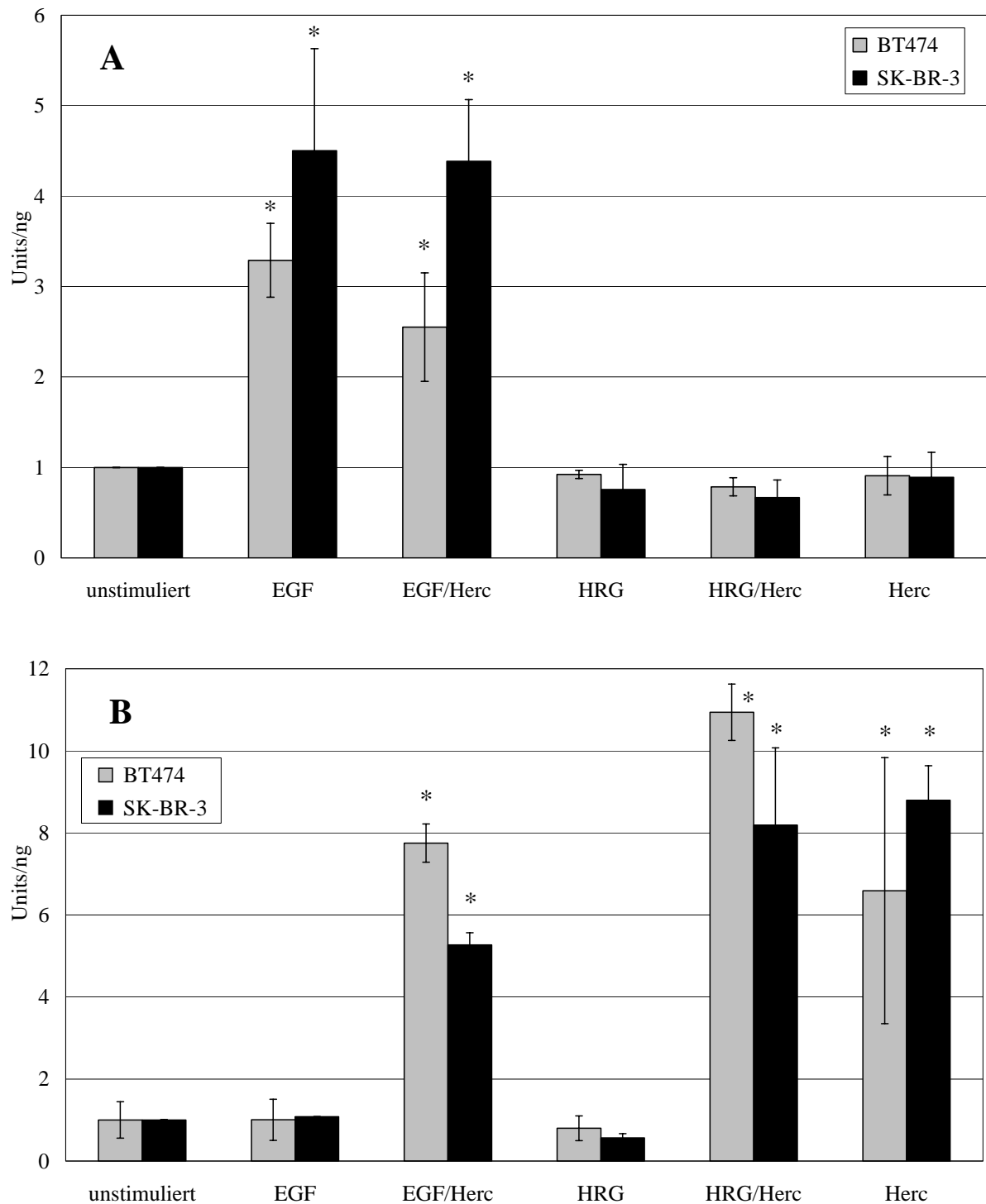
Mit Hilfe von ELISA-Experimenten wurde die Aktivierung der Rezeptoren EGFR und c-erbB2 in Abhängigkeit von der Stimulation mit EGF, HRG und Herceptin jeweils alleine und in Kombination untersucht. Dazu fanden kommerziell verfügbare ELISA-Kits (Cell

Signaling Technology) zur Quantifizierung der Aktivierung des EGFR am Tyrosin 1173 bzw. der gesamten Tyrosin-Phosphorylierung des c-erbB2 Verwendung. Zusätzlich zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrads wurde in parallelen ELISA-Experimenten der Gesamt-Rezeptor-Gehalt in den jeweiligen Proben bestimmt, um durch Quotientenbildung der erhaltenen Werte die Phosphorylierung in Units pro ng Rezeptor angeben zu können (vgl. Abb. 22). Alle gezeigten Daten sind jeweils für BT474 und SK-BR-3 auf unbehandelte Zellen normiert.

Das Tyrosin 1173 stellt eine der Haupt-Autophosphorylierungsstellen des EGFR dar. Nach Bindung von Adaptor- und Signalproteinen werden über diesen Tyrosinrest Liganden-induzierte Stimuli an den Ras-MAPK-Signalweg weitergeleitet, der ein bedeutendes Element in der mitogenen Signaltransduktion bildet und generell mit einer Stimulation der Zellproliferation in Verbindung gebracht wird (95). Mit Shp1 bindet an pY1173 auch eine Protein-Phosphatase, die durch Dephosphorylierung des EGFR, weiterer erbB-Dimerisierungspartner oder von nachgeschalteten Effektorproteinen die Signalleitung reguliert (58).

Der Prozentsatz der am Tyrosinrest 1173 phosphorylierten EGF-Rezeptoren lässt sich bei BT474 und SK-BR-3 mit EGF-Stimulation im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant erhöhen (Abb. 22 A). Dabei zeigt die Zelllinie SK-BR-3 einen stärkeren EGF-vermittelten Anstieg der Phosphorylierung als BT474. Die Anwesenheit von Herceptin hat bei SK-BR-3 auf die EGF-induzierte Phosphorylierung des EGFR am Tyrosin 1173 keinen Einfluss. Bei BT474 zeigt sich jedoch durch den geringeren Wert bei der Applikation von EGF/Herceptin im Vergleich zu EGF alleine die Tendenz, dass Herceptin die durch EGF erwirkte Phosphorylierung am EGFR vermindern kann. In den ELISA-Experimenten konnte für keine weiteren Stimuli (HRG, Herceptin bzw. deren Kombination) ein signifikanter Unterschied zur Kontrollsituation festgestellt werden (Abb. 22 A).

Die Analyse der Gesamt-Phosphorylierung des c-erbB2 (Abb. 22 B) zeigt bei beiden untersuchten Zelllinien sowohl bei Herceptin-Behandlung als auch bei kombinierter Inkubation der Zellen mit Herceptin und EGF bzw. HRG eine signifikante Erhöhung des Phosphorylierungsgrads von c-erbB2. Der höchste Level an c-erbB2-Phosphorylierung wird bei SK-BR-3 durch die Kombination von HRG mit Herceptin bzw. durch Herceptin alleine erreicht. Bei BT474 zeigt die gleichzeitige Behandlung mit HRG und Herceptin den höchsten Anstieg in Bezug auf die Gesamt-Phosphorylierung des c-erbB2. Bei alleiniger Applikation der Wachstumsfaktoren EGF und HRG ist weder für BT474 noch für SK-BR-3 eine Veränderung im Vergleich zur unbehandelten Situation zu erkennen.



**Abb. 22: Phosphorylierung von EGFR (A) und c-erbB2 (B) bei BT474 und SK-BR-3, normiert auf unbehandelte Zellen, im Vergleich zur Stimulation mit EGF, EGF/Herceptin, HRG, HRG/Herceptin und Herceptin. Für den EGFR (A) ist die Phosphorylierung am Tyrosin 1173 gezeigt, in B ist der Gesamt-Phosphorylierungsgrad aller Tyrosinstellen des c-erbB2 dargestellt. Angegeben ist das Ausmaß der Phosphorylierung in Units/ng Gesamtprotein an EGFR bzw. c-erbB2. Signifikante Änderungen im Vergleich zu unstimulierten Zellen sind mit \* markiert.**



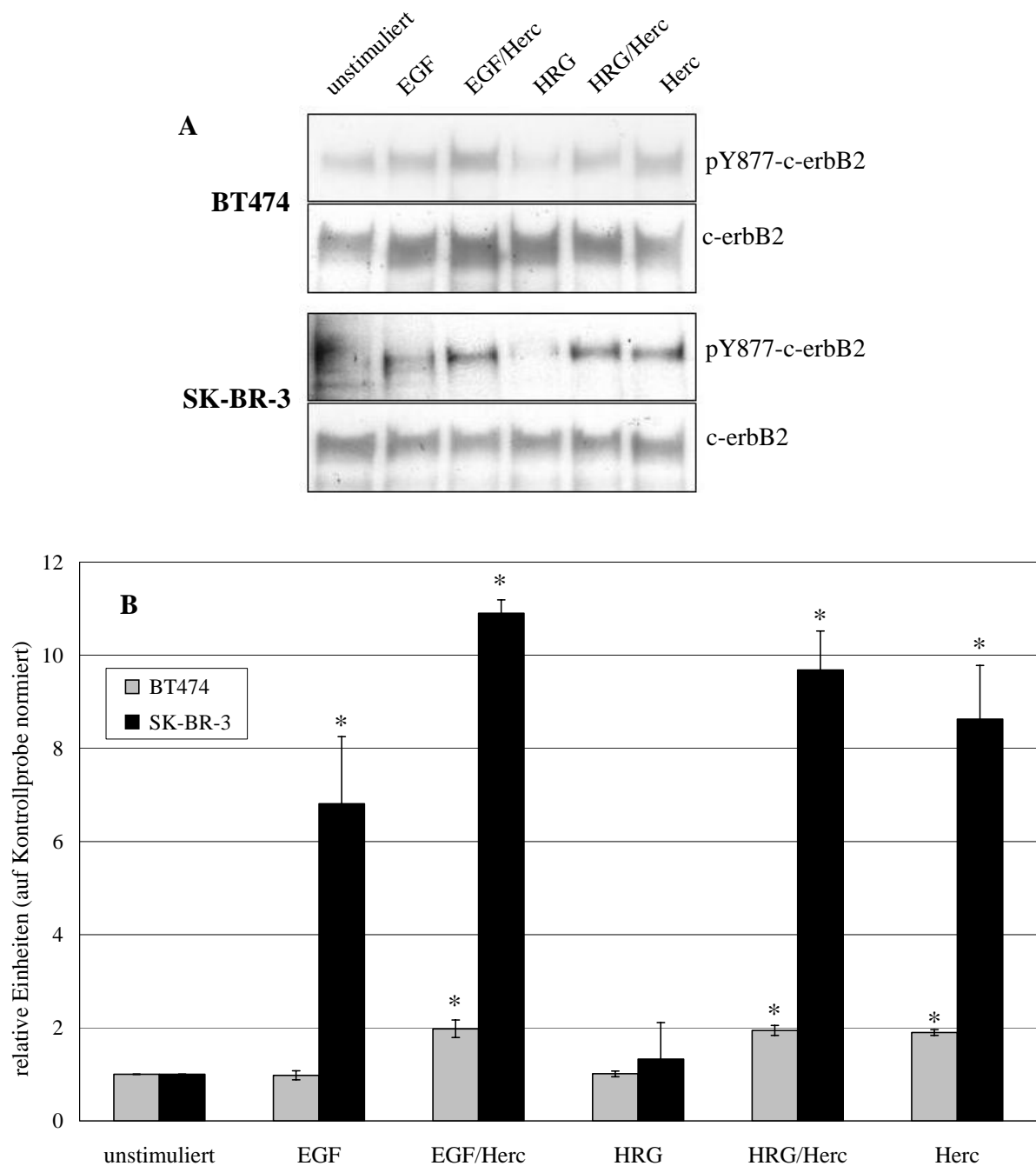
### 5.2.2 SDS-PAGE und Western-Blot

Der Respons einer Zelle auf eine Stimulierung wird durch ein vom Liganden und Dimerisierungspartner abhängiges Phosphorylierungsmuster an den intrazellulären Tyrosinstellen der erbB-Rezeptoren und der dadurch determinierten Auswahl und Abstimmung verschiedener Signaltransduktionswege vermittelt (vgl. 1.1.2). Die Dynamik der Signaltransduktion liegt damit nicht einfach in der Addition der Funktion der beteiligten Rezeptoren und Phosphorylierungsstellen, sondern vielmehr in im Zuge der Rezeptor-interaktion neu entstehenden Möglichkeiten in der Vielfalt der Signalweiterleitung. Um die Bedeutung der einzelnen Phosphotyrosinstellen des c-erbB2 bei der Signalleitung durch EGF, HRG und/oder Herceptin zu untersuchen, wurde mit der Western-Blot Technik die spezifische Phosphorylierung an den Tyrosinresten 877, 1112 und 1248 des c-erbB2 analysiert.

Phosphorylierungs- stelle von c-erbB2	Mechanismus der Phosphorylierung	Bindungsproteine	Funktion der Phosphorylierungsstelle
Y877	Src-Kinase		Regulation der Rezeptoraktivität
Y1112	Autophosphorylierung	c-Cbl (E3 Ubiquitin-Ligase)	Lysosomaler Abbau $\Rightarrow$ Signalattenuation
Y1248	Autophosphorylierung	Shc (Adaptorprotein)	Ras-MAPK $\Rightarrow$ Proliferation

**Tab. 10: Phosphorylierungsstellen Y877, Y1112 und Y1248 des c-erbB2. Die Phosphorylierung am Y877 erfolgt durch die Src-Kinase, Y1112 und Y1248 sind Autophosphorylierungsstellen. Es sind die spezifisch an die phosphorylierten Tyrosinreste bindenden Proteine angegeben und die Funktion bzw. der Effekt von deren Signaltransduktion aufgeführt (9,24,65,72).**

Die drei Phosphotyrosine Y877, Y1112 und Y1248 haben für die nachgeschaltete Signaltransduktion eine unterschiedliche Funktion (Tab. 10). Der Aminosäurerest 877 befindet sich in der Kinasedomäne des c-erbB2. In Analogie zu anderen Protein-Tyrosin-Kinasen wird angenommen, dass eine durch die Src-Kinase vermittelte Phosphorylierung an dieser Stelle die TK-Aktivität des c-erbB2 positiv reguliert (24). Mit dem Tyrosinrest Y1112 besitzt der c-erbB2 Rezeptor eine Bindungsstelle für die E3 Ubiquitin-Ligase c-Cbl (72), die nach Rezeptor-Internalisierung den lysosomalen Abbau vermittelt (9). Mit diesem posttranslationalen Regulationsmechanismus kann die Signaltransduktion terminiert und damit z. B. ein die Zellproliferation stimulierendes oder anti-apoptotisch wirkendes Signal abgeschaltet werden (9,48,95). Das Tyrosin 1248 ist analog zum Tyrosin 1173 des EGFR (vgl. 5.2.1) eine der Haupt-Autophosphorylierungsstellen des c-erbB2 und vermittelt durch die Bindung des Adaptorproteins Shc über die Ras-MAPK-Kaskade Signale zur Stimulation der Proliferation (65).



**Abb. 23 A:** Western-Blots von BT474 und SK-BR-3. Gezeigt ist die vom Behandlungsmodus (unstimuliert, EGF, EGF/Herceptin, HRG, HRG/Herceptin bzw. Herceptin) abhängige Phosphorylierung von c-erbB2 am Tyrosin 877 (jeweils obere Abbildung bei jeder Zelllinie). Der Ausschnitt jeweils unterhalb zeigt die Detektion eines parallel durchgeführten und entwickelten Western-Blot zum Nachweis des c-erbB2 Gesamtproteins in jeder Spur.

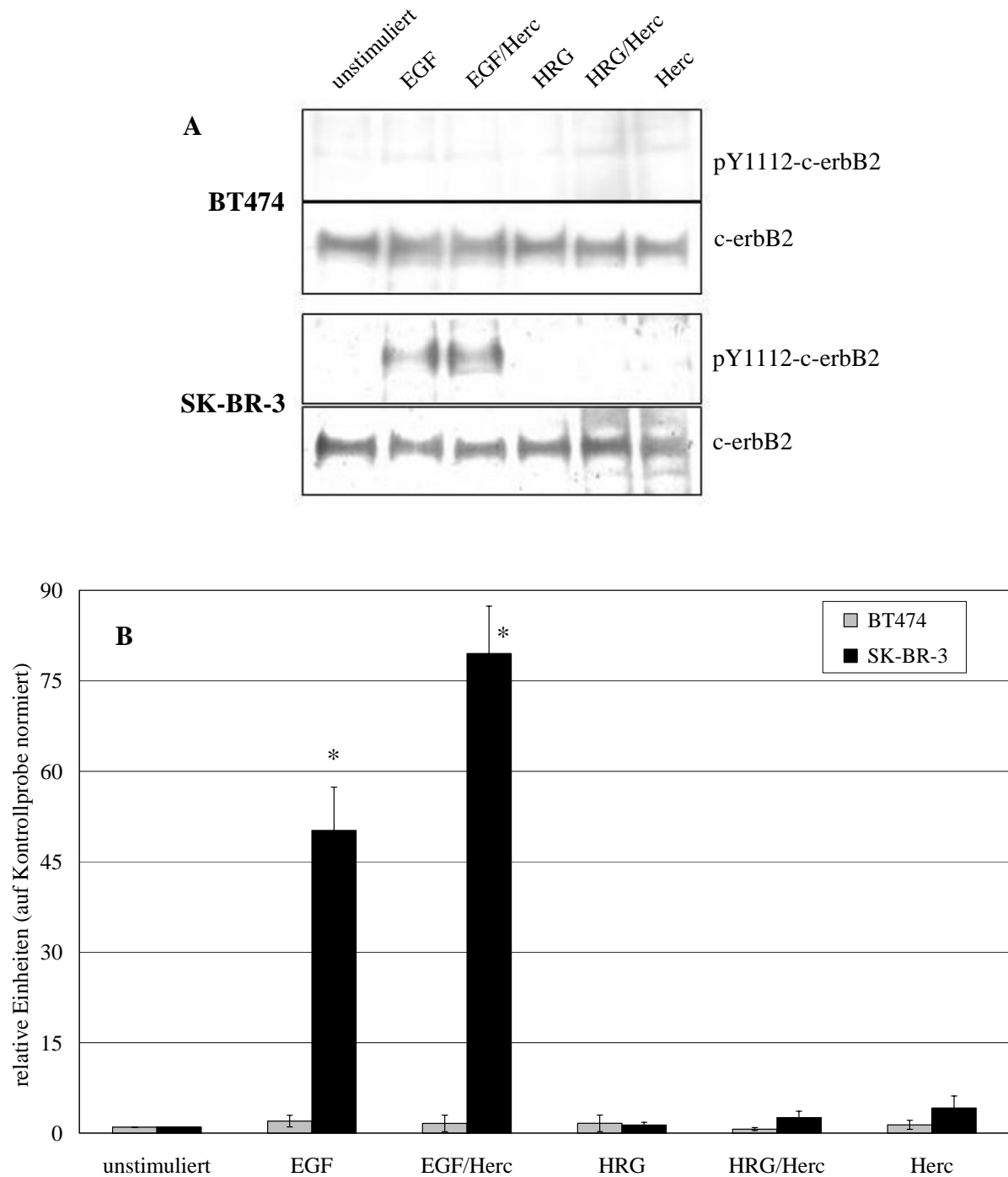
**B:** Densitometrische Auswertung von drei Western-Blot Versuchen zur Untersuchung der Wachstumsfaktor- und/oder Herceptin-induzierten Phosphorylierung am Tyrosin 877 des c-erbB2 bei BT474 und SK-BR-3. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente mit drei unterschiedlichen Proteinlysaten ausgewertet. Signifikante Änderungen im Vergleich zu unstimulierten Zellen sind mit \* markiert.

In Abb. 23 ist für BT474 und SK-BR-3 die Analyse der Phosphorylierung des Tyrosinrests 877 des c-erbB2 mit repräsentativen Western-Blots (A) mit deren densitometrischer Auswertung (B) aus dreimal mit unterschiedlichen Proteinlysaten durchgeführten Versuchen dargestellt. Die jeweils obere Abbildung in A zeigt für BT474 bzw. SK-BR-3 die Phosphorylierung am Tyrosin 877 des c-erbB2. Jeweils unterhalb der Phosphotyrosin-Blots ist die Detektion des Gesamt-c-erbB2-Gehalts gezeigt. Die Anordnung der Abbildungen für die weiteren untersuchten Phosphorylierungsstellen erfolgte in analoger Weise (vgl. Abb. 24 und Abb. 25, Teilabbildungen A).

Für BT474 (Abb. 23 A) findet sich bei allen Stimulierungsmodi, bei denen Herceptin appliziert wurde (EGF/Herceptin, HRG/Herceptin bzw. Herceptin alleine), eine im Vergleich zur Kontrolle verstärkte Phosphorylierung des c-erbB2 am Tyrosin 877. Ein analoges Muster zeigt sich für SK-BR-3: Unabhängig von der Anwesenheit der Wachstumsfaktoren EGF oder HRG bewirkt Herceptin eine Erhöhung der Phosphorylierung am Y877 des c-erbB2. Außerdem lässt sich bei SK-BR-3 in der zweiten Spur, bezogen auf die Kontrolle (Spur 1), eine EGF-stimulierte Induktion der Y877-Phosphorylierung erkennen. Ein Vergleich der unstimulierten Situation bei den beiden Zelllinien BT474 und SK-BR-3 (Spur 1 in Abb. 23 A) macht deutlich, dass die basale c-erbB2-Phosphorylierung am Y877 in BT474 im Vergleich zu SK-BR-3 ein höheres Niveau aufweist.

Zur Quantifizierung der Bandenschwärzung der Western-Blots und zur Kalkulation der Phosphorylierung relativ zur Rezeptormenge wurden sowohl die Phosphotyrosin- als auch die Gesamt-c-erbB2-Blots in jeder Spur densitometrisch vermessen. Dabei wurde die Phosphorylierung relativ zum Gesamt-c-erbB2-Gehalt gesetzt und auf den Wert der unstimulierten Zellen normiert (vgl. Abb. 23 bis Abb. 25, jeweils Teilabbildung B).

Abb. 23 B zeigt in einem Balkendiagramm für die Phosphorylierungsstelle Y877 den Mittelwert mit der zugehörigen Standardabweichung aus der densitometrischen Auswertung von drei unabhängigen Western-Blot Versuchen. Bedingt durch die geringe basale Phosphorylierung am Y877 bei SK-BR-3 (vgl. Spur 1 in Abb. 23 A) erhält man bei der Normierung auf die jeweils unbehandelte Kontrolle für diese Zelllinie aus der densitometrischen Auswertung höhere Unterschiede in den Stimulierungsindizes als bei BT474. Abb. 23 B zeigt für BT474 bei Applikation von EGF/Herceptin, HRG/Herceptin und Herceptin und für SK-BR-3 zusätzlich bei EGF-Stimulation, jeweils zur Kontrolle signifikant unterschiedliche Stimulierungsindizes. Für SK-BR-3 und der Applikation des Wachstumsfaktors EGF steigt der Stimulierungsindex auf 6,8, der sich durch Herceptin in der Kombination mit EGF weiter auf 10,9 erhöht.



**Abb. 24 A:** Western-Blots von BT474 und SK-BR-3. Gezeigt ist die vom Behandlungsmodus (unstimuliert, EGF, EGF/Herceptin, HRG, HRG/Herceptin bzw. Herceptin) abhängige Phosphorylierung von c-erbB2 am Tyrosin 1112 (jeweils obere Abbildung bei jeder Zelllinie). Der Ausschnitt jeweils unterhalb zeigt die Detektion desselben Western-Blots zum Nachweis des c-erbB2 Gesamtproteins in jeder Spur.

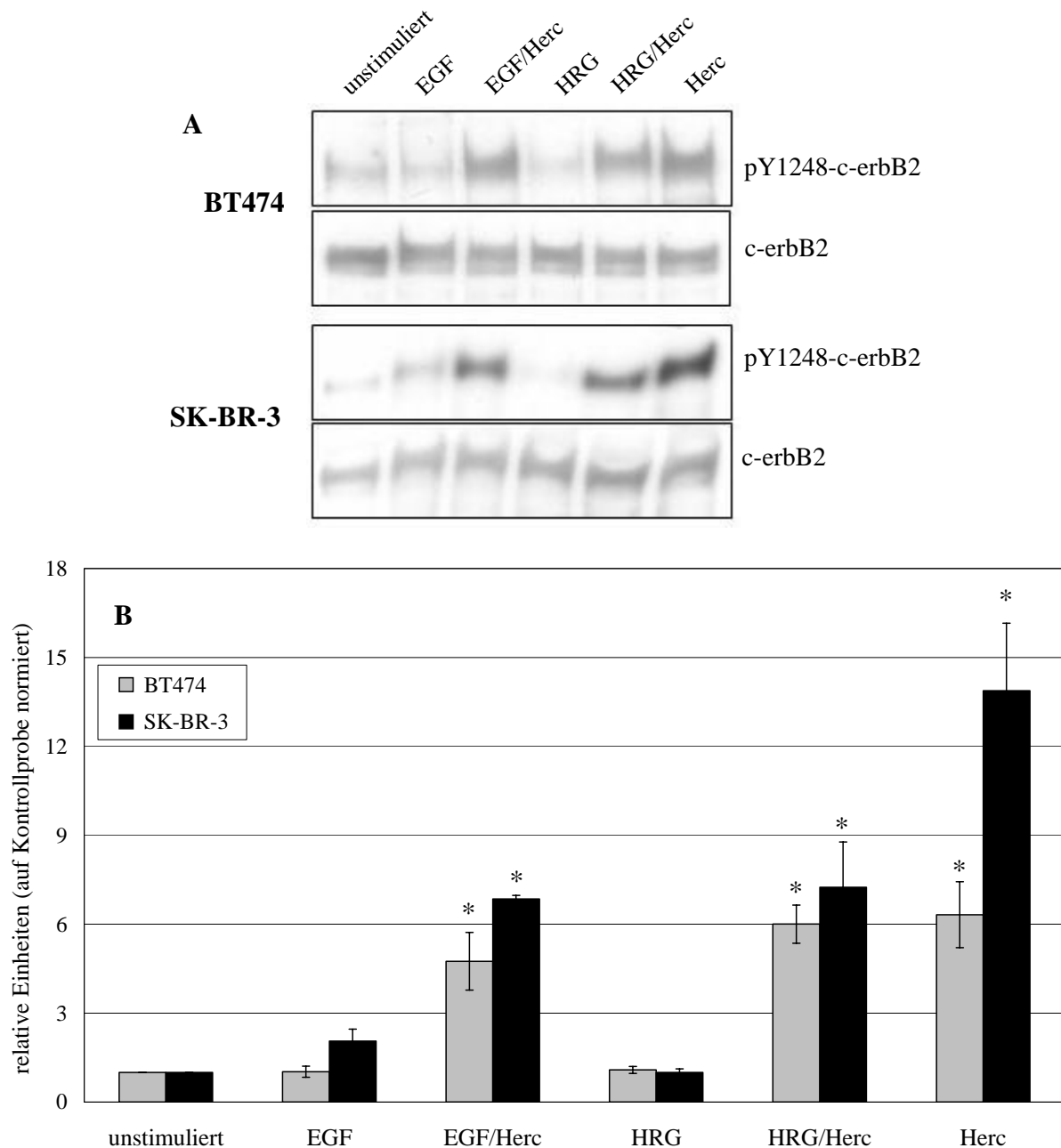
**B:** Densitometrische Auswertung von drei Western-Blot Versuchen zur Untersuchung der Wachstumsfaktor- und/oder Herceptin-induzierten Phosphorylierung am Tyrosin 1112 des c-erbB2 bei BT474 und SK-BR-3. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente mit drei unterschiedlichen Proteinlysaten ausgewertet. Signifikante Änderungen im Vergleich zu unstimulierten Zellen sind mit \* markiert.

In einem ähnlichen Bereich liegen mit 9,7 und 8,6 die Stimulierungsindizes bei HRG/Herceptin und Herceptin-Behandlung. Bei BT474 bewirkt die Applikation von EGF/Herceptin, HRG/Herceptin oder Herceptin eine jeweils 1,9-fache und damit signifikante Verstärkung der Phosphorylierung am Y877 des c-erbB2. Die Anwesenheit von HRG hat im Vergleich zu den Kontrollproben bei beiden Zelllinien keinen Effekt auf den Phosphorylierungsstatus am Y877 des c-erbB2. Ebenso bewirkt die EGF-Stimulation für BT474 keine Änderung im pY877-c-erbB2-Gehalt.

In Abb. 24 sind in A für BT474 und SK-BR-3 repräsentative Western-Blots der Detektion von pY1112 des c-erbB2 (jeweils Blots oberhalb) und des entsprechenden c-erbB2 Proteins (jeweils Blots unterhalb) gezeigt. Die zugehörigen, densitometrisch gewonnenen Daten enthält Abb. 24 B. Bei BT474 ist weder im Western-Blot noch bei der densitometrischen Auswertung bei den verschiedenen Behandlungsmodi eine Phosphorylierung von c-erbB2 am Tyrosin 1112 zu erkennen. Für SK-BR-3 hingegen ergibt die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor EGF und die kombinierte Applikation von EGF und Herceptin im Western-Blot einen erhöhten Phosphorylierungslevel am Tyrosin 1112 des c-erbB2. In Analogie dazu steht die densitometrische Analyse (Abb. 24 B): Für SK-BR-3 ist im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen bei EGF- bzw. bei EGF/Herceptin-Stimulation eine 50-fache bzw. 80-fache Erhöhung des Stimulierungsindex zu erkennen. Jedoch kann durch keinen anderen Behandlungsmodus bei SK-BR-3 eine Erhöhung des Phosphorylierungsgrads am Tyrosin 1112 erreicht werden.

Repräsentative Western-Blots zur Untersuchung des vom Behandlungsmodus abhängigen Phosphorylierungsstatus am Tyrosin 1248 des c-erbB2 sind für BT474 und SK-BR-3 in Abb. 25 A dargestellt. Der obere Abschnitt zeigt jeweils die Phosphorylierung am Y1248 des c-erbB2, unterhalb ist analog zu den vorangegangenen Abbildungen die Detektion des Gesamt-c-erbB2-Gehalts gezeigt.

Für beide Zelllinien verstärkt Herceptin die Phosphorylierung am Tyrosin 1248 sowohl für die alleinige Behandlung mit Herceptin als auch für die Kombination von Herceptin mit den Wachstumsfaktoren EGF oder HRG. Die densitometrische Auswertung von drei dieser pY1248-c-erbB2 bzw. c-erbB2 Western-Blots pro Zelllinie (Abb. 25 B) zeigt, dass Herceptin, unabhängig davon, ob es alleine oder in Kombination mit EGF oder HRG zu den Zellen gegeben wird, die Phosphorylierung am Tyrosin 1248 signifikant erhöht. Bei BT474 resultiert daraus eine auf einen gleichen Level ansteigende Phosphorylierung bei der Zellstimulation mit EGF/Herceptin, HRG/Herceptin und Herceptin alleine (Stimulierungsindizes: 4,7; 6,0; 6,3).



**Abb. 25 A:** Western-Blots von BT474 und SK-BR-3. Gezeigt ist die vom Behandlungsmodus (unstimuliert, EGF, EGF/Herceptin, HRG, HRG/Herceptin bzw. Herceptin) abhängige Phosphorylierung von c-erbB2 am Tyrosin 1248 (jeweils obere Abbildung bei jeder Zelllinie). Der Ausschnitt jeweils unterhalb zeigt die Detektion desselben Western-Blots zum Nachweis des c-erbB2 Gesamtproteins in jeder Spur.

**B:** Densitometrische Auswertung von drei Western-Blot Versuchen zur Untersuchung der Wachstumsfaktor- und/oder Herceptin-induzierten Phosphorylierung am Tyrosin 1248 des c-erbB2 bei BT474 und SK-BR-3. Es wurden drei voneinander unabhängige Experimente mit drei unterschiedlichen Proteinlysaten ausgewertet. Signifikante Änderungen im Vergleich zu unstimulierten Zellen sind mit \* markiert.

Bei SK-BR-3 jedoch ist der Stimulierungsindex bei Applikation von Herceptin ohne Wachstumsfaktoren (13,9) im Vergleich zur Behandlung mit EGF/Herceptin (6,9) bzw. HRG/Herceptin (7,2) erhöht. Wird EGF oder HRG alleine zugegeben, findet sich bei BT474 keine Änderung im Phosphorylierungsgrad am Tyrosin 1248 des c-erbB2. Auch bei SK-BR-3 bewirkt die HRG-Applikation keine Phosphorylierung des Y1248 im Vergleich zum Niveau

der Kontrolle. Mit EGF jedoch zeigt sich bei SK-BR-3 die Tendenz zu einer leicht gesteigerten Phosphorylierung des c-erbB2 an diesem Tyrosinrest.

### 5.3 REZEPTOR-INTERAKTIONEN VON EGFR UND C-ERBB2

Nach der Bindung eines Liganden ist der erste Schritt für die Weiterleitung eines Signals durch erbB-Rezeptoren die laterale Signaltransduktion, d. h. die Interaktion der Rezeptoren dieser Familie auf der Zelloberfläche. Die Dynamik in der Signaltransduktion liegt dabei nicht nur in der Ausbildung von 10 verschiedenen Kombinationen von Homo- und Heterodimeren (150) und der Addition der Funktion der beteiligten erbB-Rezeptoren und Phosphorylierungsstellen, sondern in einer sowohl vom Liganden als auch vom Dimer determinierten, nachgeschalteten Signaltransduktion mit einem spezifischen zellulären Respons.

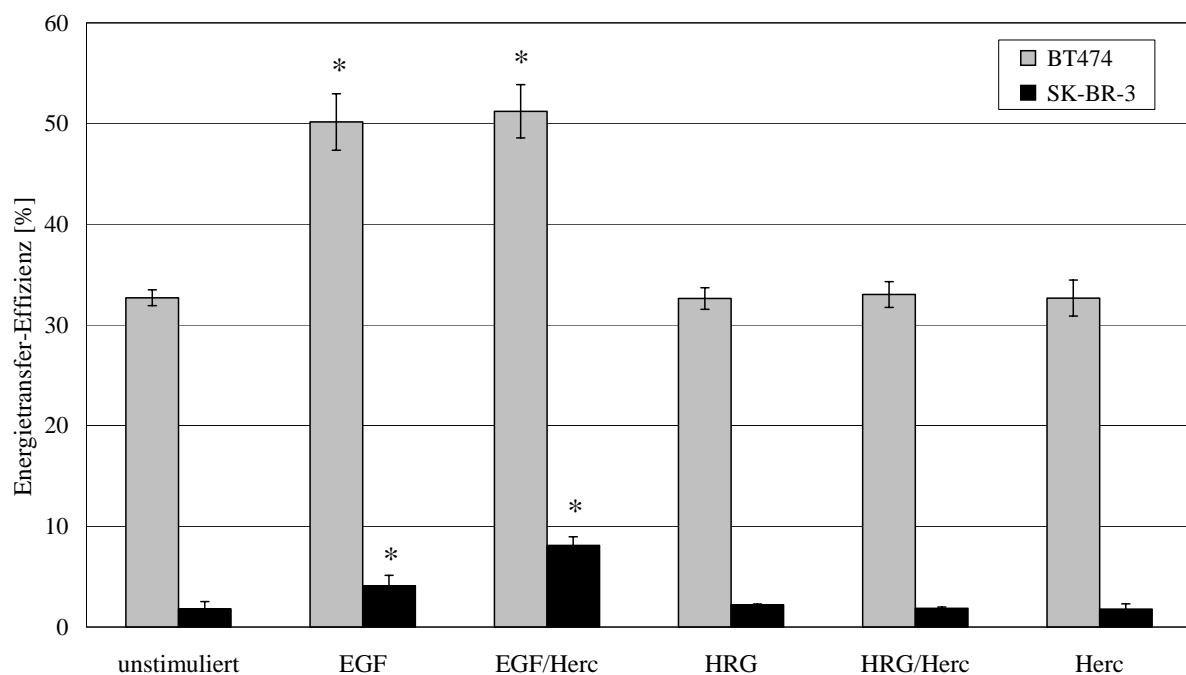
Um die Abhängigkeit dieser Liganden-induzierten Dimerisierungsprozesse im Hintergrund der c-erbB2 Überexpression auf die Bedeutung der differentiellen Koexpression des EGFR hin zu untersuchen, wurden bei den c-erbB2 überexprimierenden Mammakarzinom-Zelllinien SK-BR-3 (hoher EGFR-Gehalt, vgl. 3.1) und BT474 (ca. 1/3 des EGFR-Gehalts von SK-BR-3) die Homodimerisierung des EGFR bzw. des c-erbB2 und die EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung mit Hilfe der FRET-Technik durchflusszytometrisch untersucht. Dazu wurden die Zellen mit Farbstoff-markierten Antikörpern gegen den EGFR bzw. c-erbB2 gefärbt und nach Laser-Anregung die Energietransfer-Effizienz  $E$  zwischen Donor- und Akzeptor-Farbstoff gemessen.

#### 5.3.1 EGFR Homodimerisierung

Abb. 26 stellt prozentual die Energietransfer-Effizienz ( $E$ ) für die Homodimerisierung des EGFR bei BT474 und SK-BR-3 dar. Dabei wird die Stimulierung mit den Wachstumsfaktoren EGF und HRG, jeweils mit und ohne Herceptin, und die Applikation von Herceptin alleine mit unbehandelten Zellen verglichen.

Bei der Kontrollprobe von BT474 Zellen liegt  $E$  schon bei einem hohen basalen Wert von 32,7%. Nach EGF-Applikation erhöht sich die Energietransfer-Effizienz weiter auf 50,2%. Dieser EGF-induzierte Anstieg wird durch die gleichzeitige Gabe von Herceptin nicht signifikant beeinflusst, d. h.  $E$  bleibt bei Applikation von EGF/Herceptin mit 51,2% auf dem Niveau der EGF-Stimulation. Bei HRG-, HRG/Herceptin- bzw. Herceptin-behandelten Zellen liegt  $E$  bei 32,6%, 33,0% bzw. 32,7% und damit auf dem Level von Kontrollzellen. D. h., dass sowohl HRG als auch Herceptin jeweils für sich alleine oder in Kombination im Vergleich zu unbehandelten Zellen keinen Effekt auf die EGFR Homodimerisierung haben.

SK-BR-3 Zellen zeigen ein im Vergleich zu BT474 vollkommen unterschiedliches Muster an Wachstumsfaktor/Herceptin-abhängiger EGFR Homodimerisierung. Im unstimulierten Zustand kann bei SK-BR-3 mit 1,79% nur ein äußerst geringer Level an Energietransfer zwischen den Farbstoffen der markierten EGF-Rezeptoren gemessen werden. Mit EGF-Stimulation lässt sich E bis auf 4,1% erhöhen. Dieser, den Energietransfer steigernde Effekt des EGF kann durch die gleichzeitige Applikation mit Herceptin weiter auf 8,1% verstärkt werden. Bei der Zellbehandlung mit HRG, HRG/Herceptin oder Herceptin alleine zeigt sich jedoch im Vergleich zu Kontrollzellen keine Änderung der Energietransfer-Effizienz: E bewegt sich mit 2,2%, 1,9% und 1,8% jeweils im Bereich der Kontrolle.



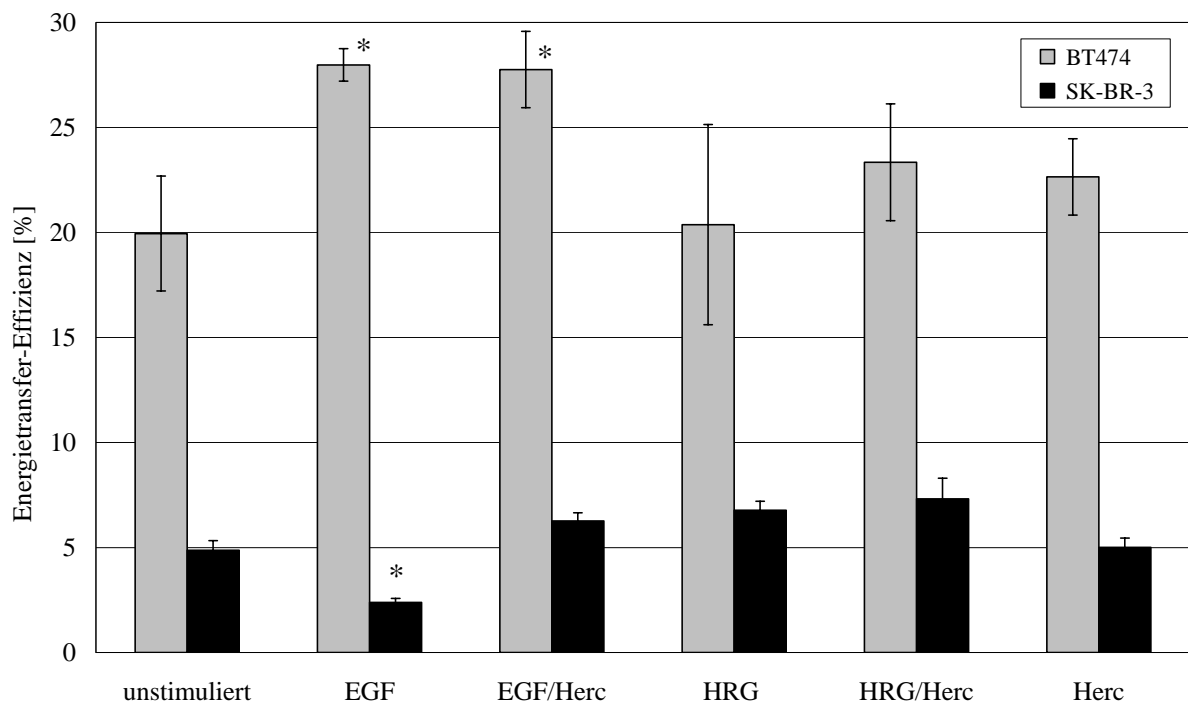
**Abb. 26:** Energietransfer-Effizienz E für die EGFR Homodimerisierung bei BT474 (grau) und SK-BR-3 (schwarz). Die Zellen wurden unbehandelt belassen oder mit EGF, EGF/Herceptin, HRG, HRG/Herceptin oder Herceptin stimuliert. Signifikante Änderungen im Vergleich zu unstimulierten Zellen sind mit \* markiert.

### 5.3.2 EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung

Die Heteroassoziation von EGFR und c-erbB2 (Abb. 27) zeigt für BT474 und SK-BR-3 sowohl für die unbehandelte Situation als auch für die untersuchten Stimuli ein unterschiedliches Muster. In unstimulierten Zellen findet sich bei BT474 mit 20% ein höherer Level an gemessener Energietransfer-Effizienz im Vergleich zu SK-BR-3 mit 4,9%. Bei BT474 lässt sich E durch EGF-Stimulation weiter auf 28,0% steigern. Im gleichen Bereich (27,7%) liegt die Energietransfer-Effizienz für die EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung bei gleichzeitiger Applikation von EGF und Herceptin. Bei BT474 übt Herceptin somit keinen



Effekt auf den EGF-induzierten Anstieg von E aus. Der c-erbB3/c-erbB4-spezifische Wachstumsfaktor HRG hat bei BT474 keinen Einfluss auf die Energietransfer-Effizienz der EGFR/c-erbB2 Heteroassoziation, was sich in einem im Bereich der Kontrollzellen liegenden E-Wert von 20,4% widerspiegelt. Auch die gleichzeitige Applikation von HRG/Herceptin und die alleinige Gabe von Herceptin haben bei BT474 im Vergleich zur Kontrollsituation keine signifikante Änderung im Ausmaß des Energietransfers zur Folge (vgl. Abb. 27).



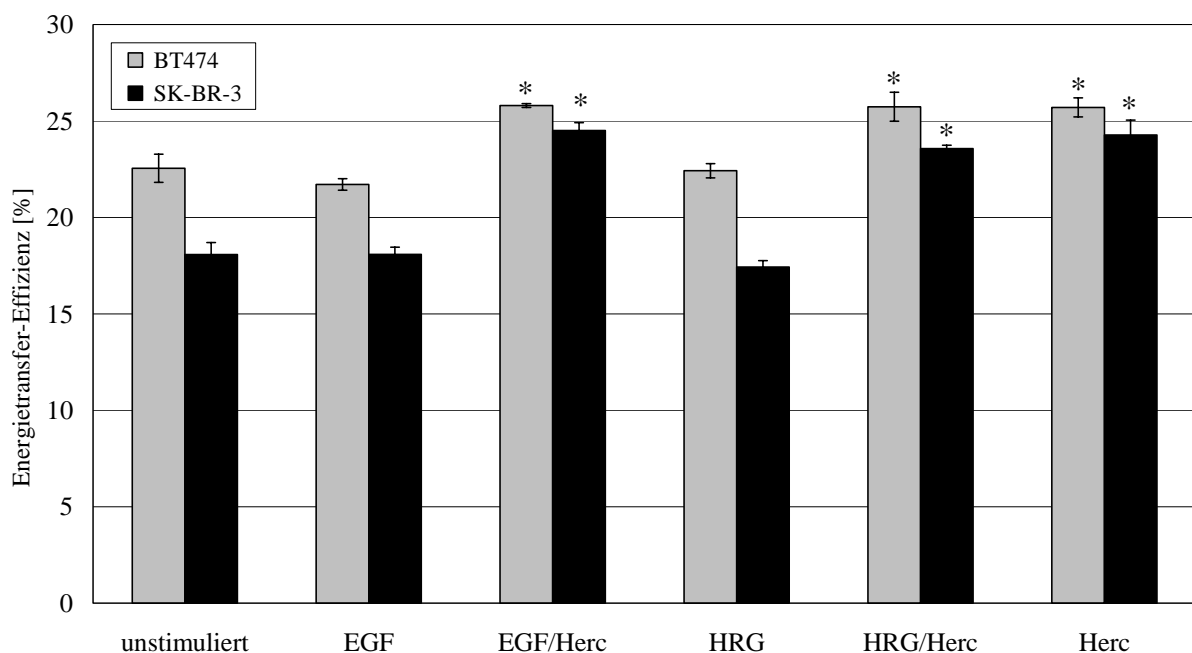
**Abb. 27:** Energietransfer-Effizienz E für die EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung bei BT474 (grau) und SK-BR-3 (schwarz). Die Zellen wurden unbehandelt belassen oder mit EGF, EGF/Herceptin, HRG, HRG/Herceptin oder Herceptin stimuliert. Signifikante Änderungen im Vergleich zu unstimulierten Zellen sind mit \* markiert.

Im Vergleich zu BT474 finden sich für SK-BR-3 bei allen Stimulierungsmodi geringere Werte für E. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Zelllinien äußert sich bei den unterschiedlichen Stimulierungsmodi. Im Gegensatz zu BT474 bewirkt die EGF-Applikation bei SK-BR-3 eine signifikante Verringerung der Energietransfer-Effizienz auf 2,4% im Vergleich zur Kontrollsituation (E = 4,9%). Dieser Effekt kann in Gegenwart von Herceptin nicht beobachtet werden, was in einem, im Vergleich zu unstimulierten Zellen nicht signifikant erhöhten E-Wert von 6,3% zum Ausdruck kommt. Ebenfalls zu keinem signifikanten Unterschied in der Energietransfer-Effizienz in Bezug auf unstimulierte Zellen kommt es bei SK-BR-3 bei der Behandlung mit HRG (6,8%) und HRG/Herceptin (7,3%). In Analogie zu BT474 kann bei SK-BR-3 die alleinige Applikation von Herceptin mit einer

Energietransfer-Effizienz von 5,0% keine Änderung für die EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung relativ zur Kontrollsituation bewirken.

### 5.3.3 C-erbB2 Homodimerisierung

Abb. 28 zeigt die Energietransfer-Effizienz E für die c-erbB2 Homodimerisierung bei BT474 und SK-BR-3 nach Stimulierung mit EGF, HRG und Herceptin in den angegebenen Kombinationen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Ohne die Zugabe von Wachstumsfaktoren oder Herceptin zum Kulturmedium weisen sowohl BT474 als auch SK-BR-3 Zellen mit E-Werten von 22,6% bzw. 18,1% einen für beide Zelllinien ähnlich hohen Level an c-erbB2 Homodimerisierung auf. Werden die Zellen mit Herceptin entweder alleine oder in Kombination mit EGF oder HRG stimuliert, zeigt die Energietransfer-Effizienz einen signifikanten Anstieg auf etwa den gleichen E-Wert für die verschiedenen Behandlungsmodi mit Herceptin im Bereich von 26% bei BT474 bzw. 24% bei SK-BR-3. Für die alleinige Stimulation mit den Wachstumsfaktoren EGF oder HRG ändert sich die Energietransfer-Effizienz gegenüber unstimulierten Zellen nicht.



**Abb. 28:** Energietransfer-Effizienz E für die c-erbB2 Homodimerisierung bei BT474 (grau) und SK-BR-3 (schwarz). Die Zellen wurden unbehandelt belassen oder mit EGF, EGF/Herceptin, HRG, HRG/Herceptin oder Herceptin stimuliert. Signifikante Änderungen im Vergleich zu unstimulierten Zellen sind mit \* markiert.

## 6 DISKUSSION

Der c-erbB2 Rezeptor hat für die Diagnose, die Prognose und als therapeutisches Target bei der Behandlung des Mammakarzinoms eine entscheidende Bedeutung. Im Jahr 1998 erfolgte für Deutschland die Zulassung von Herceptin, der als humanisierter monoklonaler Antikörper an c-erbB2 bindet und einen Anti-Tumor-Effekt zeigt (20,141). Dies stellt einen wesentlichen Fortschritt in der spezifischen Therapie des c-erbB2 überexprimierenden, metastasierten Mammakarzinoms dar, auf die jedoch nur 50% der Patientinnen bei adjuvanter Therapie ansprechen (115). In den letzten Jahren deutete sich aus *in vitro* und *in vivo* Studien ab, dass die Progredienz des Mammakarzinoms nicht alleine von der c-erbB2-Überexpression determiniert sein kann, sondern von zusätzlichen Parametern wie z. B. der Koexpression der weiteren erbB-Rezeptoren abhängen muss (118). Dies ordnet dem Nachweis eines einzelnen erbB-Rezeptors nur eine eingeschränkte Wertigkeit für die Voraussage des Therapieansprechens zu (123,136).

Um die Bedeutung der Koexpression des EGFR als ein weiteres Mitglied der erbB-Rezeptorfamilie im Hintergrund der c-erbB2-Überexpression herauszuarbeiten, wurden *in vitro* Untersuchungen mit den Mammakarzinom-Zelllinien BT474 und SK-BR-3 unternommen, die als Modell für eine c-erbB2-Überexpression dienen und den EGFR in unterschiedlicher Dichte koexprimieren: Während BT474 einen geringen EGFR-Gehalt aufweist, wird dieser erbB-Rezeptor von SK-BR-3 auf einem dreifach höheren Level exprimiert (vgl. 3.1). Es wurden Unterschiede im proliferativen Respons auf die erbB-spezifischen Wachstumsfaktoren EGF und HRG und dem monoklonalen Antikörper Herceptin gefunden und mit der Wachstumsfaktor- und Herceptin-abhängigen Rezeptor-Aktivierung durch Tyrosin-Phosphorylierung und der Rezeptor-Interaktion von EGFR und/oder c-erbB2 korreliert.

Bei den Proliferationsuntersuchungen stellte sich - unabhängig von der erbB-Rezeptor regulierten Zellteilung - eine zelltypspezifische BrdU-Sensitivität heraus, die eingehender untersucht wurde.

### 6.1 ZELLPROLIFERATION

Für die Analyse der Zellzykluskinetik können in der Durchflusszytometrie verschiedene Methoden verwendet werden, die die proliferierenden Zellen jeweils in einem unterschiedlichen Ausmaß mit dem Nukleotidanalogen BrdU markieren (vgl. 2.2.2 und 2.2.3). Da die BrdU-Exposition einen Einfluss auf den Ablauf des Zellzyklus haben kann, musste im Vorfeld für die verwendeten Zelllinien ein solcher Effekt ausgeschlossen werden.

Somit war es notwendig, der Analyse der Zellzykluskinetik (vgl. 6.1.2) eine Evaluation der geeigneten Messmethode (vgl. folgendes Kapitel) vorzuschalten.

#### 6.1.1 BrdU-Sensitivität

Zwei alternative Methoden, um die Zellzykluskinetik durchflusszytometrisch zu untersuchen, bieten sich mit der BrdU/Hoechst-Quenching Technik, die eine kontinuierliche Applikation von BrdU zum Zellkulturmedium erfordert (vgl. 4.1.5), und der anti-BrdU Technik, bei der zur Markierung der S-Phase Zellen eine Kurzzeitinkubation mit BrdU angewendet wird (vgl. 4.1.4). Dabei kann die Zellproliferation über verschiedene molekulare Mechanismen durch BrdU gestört werden. Dazu zählen eine DNA-Schädigung, eine Störung des Nukleotidstoffwechsels und veränderte Bindungseigenschaften der DNA gegenüber regulatorischen Proteinen, deren Funktion auf der Wechselwirkung mit der DNA beruht (63,103).

Mit der Ausnahme von RT4 Zellen ist für Tumorzellen ein inhibitorischer Effekt von BrdU auf die *in vitro* Zellproliferation nicht beschrieben (32). Es finden sich lediglich Angaben zur BrdU-Sensitivität von Fibroblasten wie z. B. NIH-3T3 Fibroblasten der Maus und hDF (*human diploid fibroblasts*), lymphoblastoiden Zelllinien und PBLs (*peripheral blood lymphocytes*) (103). In der vorliegenden Arbeit wird damit erstmals für Tumorzellen, d. h. für die Mammakarzinom-Zelllinien BT474 und SK-BR-3 sowie die Blasenkarzinom-Zelllinien RT4 und J82 beschrieben, dass eine kontinuierliche Inkubation mit BrdU unterschiedliche Effekte auf die Zellproliferation haben kann. In Übereinstimmung mit der Literatur (32) belegen die in Abb. 15 G/H und Abb. 16 gezeigten Daten, dass J82 Zellen durch BrdU nicht in ihrer Zellproliferation beeinflusst werden. Der von der Konzentration und Inkubationsdauer abhängige Einfluss von BrdU auf die Proliferation von RT4 Zellen (Abb. 15 E/F und Abb. 16) bestätigt die in der Literatur beschriebene BrdU-Sensitivität dieser Zelllinie (32). Zusätzlich wird in Abb. 15 E/F die Akkumulation der RT4 Zellen in der G1-Phase des zweiten (G1') und dritten Zellzyklus (G1'') deutlich, was keinen Zellzyklus-Arrest sondern vielmehr eine Verlängerung der Dauer der G1-Phase darstellt. Diese Zelllinie zeigt somit schon nach unifilärer Thymidin-Substitution in der DNA während des ersten Zellzyklus eine verlängerte Dauer der folgenden G1-Phase (G1'). Nach bifilärem Einbau von BrdU während des zweiten Zellzyklus kommt dieser Effekt in analoger Weise, d. h. in Form einer Retardation in der G1-Phase im darauf folgenden Zellzyklus (G1'') zum Ausdruck. Im Gegensatz dazu findet sich bei BT474 und SK-BR-3 erst nach bifilärer BrdU-Inkorporation in die DNA eine Verzögerung im Progress durch den Zellzyklus, was sich anhand einer Akkumulation der Zellen in der G1''-Phase des dritten Zellzyklus erkennen lässt (Abb. 15 A/B und C/D). Dass diese

Akkumulation in der G1''-Phase auf einer Retardation der Zellproliferation beruht und nicht durch das Austreten der Zellen aus der aktiv am Zellzyklus teilnehmenden Population bedingt ist, wird in Abb. 21 (Kontrolle) deutlich, in der nach 96 h BrdU-Inkubation von BT474 und SK-BR-3 die Fraktion an G0-Phase Zellen auf einem geringen Niveau von 1,8% bzw. 1,9% verbleibt.

BT474 Zellen zeigen nach 24- und 48-stündiger BrdU-Inkubation mit einer SPF im Bereich von 26% bzw. 39% eine transient erhöhte Fraktion an Zellen in der S-Phase, die nach 96 h BrdU-Exposition in Analogie zu RT4 und SK-BR-3 auf ein Niveau sinkt, das unter dem der Kontrollzellen liegt (Abb. 15 bis Abb. 17 und Abb. 19). Eine BrdU-induzierte Stimulation der Proliferation ist bislang nicht bekannt und kann damit höchstwahrscheinlich als Ursache für die erhöhte SPF ausgeschlossen werden (27). Diese Schlussfolgerung wird dadurch bekräftigt, dass bei einer stimulierten Zellproliferation die SPF auch in höheren Zellzyklen einen hohen Wert aufweisen müsste, die vorliegenden Daten jedoch bei BT474, wie auch bei den weiteren untersuchten Zelllinien, eine verringerte SPF in S' und S'' zeigen (Abb. 16 und Abb. 19). Auch eine artifizielle Erhöhung der SPF durch apoptotische Zellen, die im Verlauf des kontrollierten Zelltods durch DNA- und Zellfragmentierung an DNA-Gehalt verlieren und somit in einer bestimmten Phase der Apoptose mit ihrem DNA-Gehalt in den Größenbereich von S-Phase Zellen gelangen könnten, wurde durch Apoptose-Messungen mit Hilfe der Annexin-V/PI Färbung ausgeschlossen (Abb. 18). Als Ursache für die hohe SPF bei BT474 zum 24-h und 48-h Zeitpunkt nach BrdU-Zugabe kann ein verzögerter Austritt aus der G1-Phase des ersten Zellzyklus in Betracht gezogen werden. Obwohl diese Zellen noch kein BrdU in die DNA eingebaut haben, kann die zusätzliche Präsenz von BrdU eine Störung des Nukleotidstoffwechsels einer Zelle und damit eine Retardation in der G1-Phase hervorrufen. Treten diese synchronisierten Zellen aus der G1-Phase aus, resultiert daraus eine Anhäufung an Zellen in der S-Phase des ersten Zellzyklus (27). Um einen Einfluss von BrdU auf die Zellproliferation vorzubeugen, wird in der Literatur die Zugabe von DC empfohlen (25,57). Die hier gezeigten, BrdU-induzierten Effekte traten jedoch trotz der Zugabe von halb-äquimolaren Konzentrationen an DC zum Kulturmedium auf (vgl. 4.1.4). Damit ist eine Störung des Nukleotidstoffwechsels nicht einfach durch die Zugabe von DC auszugleichen. Eine Analyse des Einflusses einer 30-minütigen Pulsmarkierung mit 20  $\mu$ M BrdU auf die Zellproliferation von BT474 und SK-BR-3 in Abschnitt 5.1.2 konnte in Übereinstimmung mit der Literatur (11) eine BrdU-induzierte Störung von BT474 und SK-BR-3 im Fortschreiten des Zellzyklus bei Anwendung der anti-BrdU Technik ausschließen. Ein teilweiser Austausch des Thymidin durch BrdU in nur einem DNA-Strang während der halbstündigen

Inkubationszeit mit BrdU-haltigem Medium ist somit nicht ausreichend, um bei BT474 oder SK-BR-3 Einfluss auf die Proliferation zu nehmen. Für eine BrdU-vermittelte Retardation im Zellzyklus von BT474 oder SK-BR-3 bedarf es offensichtlich der nahezu vollständigen bifilären Substitution des Thymidin durch BrdU in zwei aufeinander folgenden Zellzyklen (27). Dies ermöglicht den Einsatz der anti-BrdU Technik für detaillierte Studien zur Zellproliferation dieser beiden Zelllinien.

Ein BrdU-induzierter Effekt auf die Zellproliferation stellt sich in den hier gezeigten Daten als zell- aber offensichtlich nicht gewebespezifisch dar. Angaben über einen unterschiedlichen Effekt von BrdU für Zelllinien vom gleichen Gewebetyp finden sich auch in der Literatur. So ist für verschiedene Fibroblasten-Zelllinien einerseits schon bei 10  $\mu$ M BrdU eine Retardation im Zellzyklus beschrieben (104,106), aber andererseits konnte für NIH-3T3 Fibroblasten auch bei einer Konzentration von bis zu 300  $\mu$ M BrdU kein Einfluss durch das Nukleotidanalogen gefunden werden (103).

Die Daten zur BrdU-Sensitivität von BT474 und SK-BR-3 bei Langzeitinkubation mit diesem Nukleotidanalogen machen den Ausschluss der BrdU/Hoechst-Quenching Technik, deren kontinuierliche BrdU-Applikation die Zellen in der Proliferation stört, für die dynamische Zellzyklusanalyse notwendig. Eine ideale Anwendung findet die BrdU/Hoechst-Quenching Technik jedoch bei der Quantifizierung der Fraktion von G0-Phase Zellen (vgl. 2.2.3) (63).

#### *6.1.2 Wachstumsfaktor- und Herceptin-abhängige Zellproliferation*

Ein Überblick über die wichtigsten, im Folgenden diskutierten Ergebnisse in Bezug auf die Liganden-abhängige Zellproliferation, Rezeptor-Aktivierung und -Interaktion ist zusammenfassend in Abb. 30 dargestellt.

Die vorliegenden Daten zur Zellproliferation zeigen in Übereinstimmung mit der Literatur für BT474 und SK-BR-3 einen inhibitorischen Effekt einer Behandlung mit Herceptin (Abb. 20) (86,117). Die Wirkung von Herceptin wird dabei auf zwei Ebenen vermittelt: Zum Einen führt Herceptin zu einer Verlängerung der Zellzyklusdauer. Zum Anderen beruht der anti-proliferative Effekt von Herceptin darauf, eine Fraktion von Zellen in die G0-Phase zu überführen und von der Population der aktiv am Zellzyklus teilnehmenden Zellen abzuziehen (Abb. 21). Bei der Quantifizierung der G0-Phase Zellen zeigte die Zelllinie BT474 eine höhere Sensitivität gegenüber dem monoklonalen Antikörper als SK-BR-3, von der mit 7,9% nur etwa  $\frac{1}{4}$  der Zellenzahl von BT474 (33,2%) in die G0-Phase übertreten. Von den beiden Mammakarzinom-Zelllinien reagiert somit BT474 sensibler auf eine Herceptin-Behandlung. Der schon in der Literatur beschriebene, auf die Proliferation von SK-BR-3 inhibitorische Effekt von EGF (11,73) konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Experimentelle Daten für

die Cervixkarzinom-Zelllinie A431 und die Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-468, die beide wie SK-BR-3 eine hohe EGFR-Expression aufweisen, konnten bei EGF-Applikation ebenfalls eine anti-proliferative Wirkung feststellen. Dabei wird dieser Effekt dem hohen Level an EGFR-Expression zugeschrieben (38,79,111,132). In Analogie dazu kann für das unterschiedliche Verhalten von BT474 und SK-BR-3 auf diesen Wachstumsfaktor ebenfalls deren differenzielles EGFR-(Ko-)Expressionsmuster angesehen werden (Abb. 12).

Mit Ausnahme der inhibitorischen Wirkung von EGF bei SK-BR-3 wirken die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Wachstumsfaktoren bei beiden Zelllinien positiv auf die Zellproliferation ein und haben einen entgegengesetzten Effekt zu Herceptin (vgl. Abb. 30). Diese Kompensation der anti-proliferativen Wirkung von Herceptin durch EGF und HRG ist bei BT474 und damit bei einem geringen EGFR-Gehalt weniger stark ausgeprägt als bei SK-BR-3 mit hoher EGFR-Koexpression. Damit liegt eine höhere Sensitivität gegenüber Herceptin vor, wenn ausschließlich der c-erbB2 Rezeptor hoch exprimiert wird. Da häufig vom Tumor oder vom (Tumor-)Stroma ebenfalls Wachstumsfaktoren sezerniert werden (86), kann auch für die *in vivo* Situation eine derartige Kompensation als Mechanismus für einen fehlenden Respons des Tumors auf eine Herceptin-Therapie vorgeschlagen werden. Um diese Attenuation der Wirkung von Herceptin zu verhindern, kann in Tumoren mit entsprechender Koexpression durch eine simultane Blockierung von weiteren exprimierten erbB-Rezeptoren das Ansprechen eines Tumors auf Herceptin verbessert werden (vgl. Kapitel 8) (73). Die Daten der vorliegenden Arbeit konnten dabei der Expression des EGFR eine entscheidende Funktion bei der Regulation der Liganden-abhängigen Proliferation zuordnen. Damit wurde der EGFR als ein wichtiger Parameter identifiziert, der bei c-erbB2-Überexpression den zellulären Respons auf Wachstumsfaktoren und Herceptin determiniert.

## 6.2 WACHSTUMSFAKTOR- UND HERCEPTIN-ABHÄNGIGE ERBB-REZEPTOR-AKTIVIERUNG

Extrazelluläre Stimuli werden nach Liganden-induzierter erbB-Rezeptor-Interaktion über eine im intrazellulären Abschnitt der Rezeptoren stattfindende, gegenseitige Phosphorylierung an spezifischen Tyrosinresten oder an Effektorproteinen ins Innere der Zelle weitergeleitet (vgl. 1.1) (81). Intrazelluläre Signaldiversifizierung und -spezifizierung wird dabei über das Rezeptor-spezifische Spektrum an Phosphotyrosinen mit deren definierter Sequenzumgebung und der entstehenden 3-D Strukturumgebung bestimmt (43,94,95).

In dieser Arbeit wurden für das *in vitro* Zellkulturmodell der differentiellen Koexpression des EGFR bei c-erbB2-Überexpression mit BT474 und SK-BR-3 Unterschiede in der

Wachstumsfaktor- und Herceptin-abhängigen, spezifischen Phosphorylierung des EGFR und c-erbB2 erarbeitet und in Abb. 30 zusammengefasst. Aufgrund des geringen EGFR-Expressionslevels bei BT474 war für diesen Rezeptor eine genaue Analyse der (spezifischen) Phosphorylierung im Western-Blot nicht durchführbar. Somit wurde für die Detektion der EGFR-Phosphorylierung auf die sensitivere ELISA-Technik zurückgegriffen.

- Phosphorylierung des EGFR

Für BT474 und SK-BR-3 konnte eine EGF-induzierte EGFR-Phosphorylierung am Tyrosinrest 1173 gemessen werden. Herceptin bewirkt dabei in Kombination mit EGF lediglich bei BT474 eine Verringerung dieser durch EGF vermittelten Phosphorylierung, die jedoch nicht signifikant war.

Unter Berücksichtigung des relativen Unterschieds der EGFR-Expression in den untersuchten Mammakarzinom-Zelllinien führt die Applikation von EGF bei einer einzelnen SK-BR-3 Zelle im Vergleich zu BT474 zu einer 3,8-fachen Phosphorylierung am Y1173 des EGFR. Dieses höhere Gesamtniveau der EGF-vermittelten EGFR[Y1173]-Aktivierung einer SK-BR-3 Zelle korreliert mit einer Inhibition der Zellproliferation (Abb. 20 und Abb. 30) und steht in Einklang mit der Literatur, die einem hohen Niveau der EGFR-Signaltransduktion bei hoher EGFR-Expression einen inhibitorischen Effekt auf die Zellproliferation zuschreibt (vgl. 6.1.2) (38,79). Die geringere EGF-vermittelte Y1173-Phosphorylierung am EGFR bei BT474 in Kombination mit dessen niedrigerem EGFR-Expressionslevel hingegen steht in Verbindung mit einer Stimulation der Zellproliferation (Abb. 20 und Abb. 30). Für die Intensität der Signaltransduktion durch den EGFR könnte es damit in dem hier untersuchten Zellsystem eine Schwelle geben, ab der eine Signalinitiierung durch hoch exprimierten EGFR zur Inhibition der Proliferation führt (38). Ein weiterer Ansatzpunkt zur Erklärung dieses Zusammenhangs ist durch eine vom hohen EGFR-Expressionslevel bedingte, verstärkte Rekrutierung von Protein-Phosphatasen gegeben, die durch Dephosphorylierung den Aktivierungszustand der erbB-Rezeptoren, weiterer Adaptor- und Signalproteine und von Effektoren der Signaltransduktion regulieren können (111). So besitzt die Protein-Phosphatase Shp1 mit dem pY1173 eine direkte Bindungsstelle am EGFR (vgl. 5.2.1). Keilhack *et al.* konnten für die Funktion von Shp1 bei SK-BR-3 zeigen, dass eine EGF-induzierte, vermehrte Phosphorylierung am Y1173 des EGFR mit der verstärkten Rekrutierung dieser Protein-Phosphatase verbunden ist, dies sich negativ auf die EGF-abhängige Aktivierung des Ras-MAPK-Signalwegs auswirkt und mit einem anti-proliferativen Respons einhergeht (58). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene EGF-vermittelte Inhibition der Proliferation bei SK-BR-3 in Verbindung mit dem hohen Level an



Phosphorylierung am Y1173 des EGFR könnte somit ein Hinweis auf eine Bedeutung dieser Protein-Phosphatase in der EGF-induzierten Signaltransduktion bei SK-BR-3 sein.

Der unterschiedliche proliferative Respons der beiden untersuchten Mammakarzinom-Zelllinien auf EGF macht deutlich, dass der Expressionslevel des EGFR auch bei hoher erbB2 Expression großen Einfluss auf die Zellproliferation hat. Dieser hier beschriebene, durch den hohen EGFR-Gehalt bei SK-BR-3 bedingte inhibitorische Effekt von EGF wird zusätzlich durch die Liganden-induzierte Interaktion des EGFR mit und der Aktivierung von c-erbB2 umgesetzt (vgl. "EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung" in Kapitel 6.3.2, "Spezifische Phosphorylierung des c-erbB2" in diesem Kapitel).

Die Stimulierung mit HRG und/oder Herceptin übt auf die Y1173-Phosphorylierung des EGFR keinen Einfluss aus. Dies deutet darauf hin, dass sowohl HRG- als auch Herceptin-vermittelte Effekte auf die Proliferation (vgl. Abb. 20) weder bei BT474 noch bei SK-BR-3 über diese pY-Stelle des EGFR und damit nicht über dessen nachgeschaltete Signalwege verlaufen. Es ist jedoch für alle hier untersuchten Liganden möglich, dass weitere, in dieser Arbeit nicht untersuchte Tyrosinreste des EGFR in die proliferative oder inhibitorische Signalweiterleitung mit einbezogen werden (95,126). Die Liganden-induzierte Phosphorylierung an weiteren Tyrosinresten des EGFR muss bei BT474 und SK-BR-3 zukünftig weiter untersucht werden.

- Gesamt-Phosphorylierung des c-erbB2

Die Phosphorylierung an den Tyrosinresten des c-erbB2 wird sowohl bei BT474 als auch bei SK-BR-3 durch die Applikation von Herceptin verstärkt (Abb. 22 B). Somit geht dem anti-proliferativen Langzeit-Effekt von Herceptin eine Induktion der Tyrosin-Phosphorylierung an c-erbB2 als molekularer Mechanismus der Reaktion der Zelle auf diesen monoklonalen Antikörper voraus (vgl. Abb. 30). Dies deutet auf eine aktive inhibitorische Signaltransduktion durch Herceptin-gebundenen c-erbB2 als unmittelbar stattfindendes Ereignis einer Behandlung mit diesem Antikörper hin. Damit geht eine Rezeptor-Phosphorylierung nicht zwangsläufig mit einer Stimulation der Proliferation einher. In der Literatur ist die agonistische Wirkung von Herceptin ebenfalls beschrieben und wird mit der Synthese von *Downstream*-Effektoren der PI3K und der Induktion der Transkription in Verbindung gebracht (110,112). Eine Herceptin-vermittelte, aktive Signalweiterleitung durch c-erbB2 ist jedoch schwer mit der potenten zytostatischen Wirkung dieses Antikörpers in Einklang zu bringen (117), deren Ursache zu einem großen Teil der c-erbB2 *Downregulation* zugeschrieben wird. Die damit verbundene Verringerung der Anzahl an für die Signaltransduktion zur Verfügung stehenden c-erbB2 Rezeptoren auf der Zelloberfläche wird

dabei als wesentlicher Mechanismus bei der Vermittlung der inhibitorischen Wirkung des Antikörpers auf die Zellproliferation gesehen (vgl. 1.2.4) (151). Es ist damit noch nicht geklärt, welcher mechanistische oder molekulare Zusammenhang zwischen der agonistischen Wirkung von und der c-erbB2 *Downregulation* durch Herceptin besteht.

Die Wachstumsfaktoren EGF und HRG haben keinen, im ELISA detektierbaren Einfluss auf die Tyrosin-Phosphorylierung des c-erbB2 (Abb. 22 B). Der bei den Zelllinien BT474 und SK-BR-3 vorherrschende, hohe basale Level der Gesamt-Phosphorylierung an Tyrosinresten des überexprimierten c-erbB2 (90,117) kann somit weder durch EGF noch durch HRG beeinflusst werden (Dr. Birgit Bossenmaier, Roche, Penzberg, persönliche Kommunikation).

Die auf der Ebene der Gesamt-Phosphorylierung beobachteten Effekte setzen sich aus der Summe der Änderungen des Phosphorylierungsgrads an den einzelnen Tyrosinresten zusammen. Damit ist eine Änderung des Phosphorylierungsmusters an bestimmten intrazellulären Tyrosinresten durch eine veränderte erbB-Rezeptor Homo- oder/und Heterodimerisierung nicht ausgeschlossen, auch wenn der c-erbB2 nicht verstärkt phosphoryliert wird. Damit war es notwendig, die Korrelation von Ligandenstimulierung mit der spezifischen Phosphorylierung am c-erbB2 zu untersuchen. Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit für BT474 und SK-BR-3 der Wachstumsfaktor- und Herceptin-abhängige Phosphorylierungsstatus der Tyrosine 877, 1112 und 1248 des c-erbB2 eingehender analysiert.

- Spezifische Phosphorylierung des c-erbB2

Bei BT474 und SK-BR-3 induziert Herceptin unabhängig von einer gleichzeitigen Applikation der Wachstumsfaktoren EGF oder HRG eine Phosphorylierung am Y877, während EGF nur bei der Vermittlung eines inhibitorischen Effekts auf die Proliferation von SK-BR-3 eine Phosphorylierung am Y877 bewirkt (Abb. 23 und Abb. 30). Der anti-proliferative Einfluss von EGF bei SK-BR-3 und von Herceptin bei beiden Zelllinien wird über diesen Tyrosinrest 877 des c-erbB2 vermittelt. Somit ähneln sich die durch EGF und Herceptin getriggerten Mechanismen, die bei SK-BR-3 eine Inhibition der Proliferation bewirken. Im Gegensatz dazu haben EGF und Herceptin bei BT474 gegensätzliche Effekte auf die Proliferation. Nur bei einer anti-proliferativen Wirkung eines Wachstumsfaktors oder von Herceptin findet sich auch eine Phosphorylierung am Tyrosinrest 877 (vgl. Abb. 30).

Die Applikation von EGF verursacht außerdem ausschließlich bei SK-BR-3 eine Phosphorylierung am Y1112 (Abb. 24). Das Ausbleiben eines Effekts auf die Phosphorylierung dieses Tyrosinrests bei alleiniger Applikation von Herceptin bestätigt, dass - auch bei kombinierter Applikation von EGF und Herceptin - EGF alleine für die Phosphorylierung des Y1112 von c-erbB2 verantwortlich ist. Über diesen Tyrosinrest wird somit

ausschließlich der inhibitorische Effekt von EGF und nicht der von Herceptin vermittelt. In die Signaltransduktion von inhibitorisch wirkendem EGF ist bei SK-BR-3 damit - neben dem hohen EGFR[pY1173]-Gehalt pro SK-BR-3 Zelle (vgl. EGFR-Phosphorylierung) - auch eine Phosphorylierung an den Tyrosinen 877 und 1112 involviert (vgl. Abb. 30). Die Identifikation des Y1112 als Vermittler eines anti-proliferativen Signals steht in Einklang mit der Literatur, die den Phosphotyrosinrest 1112 als Bindungsstelle für die c-Cbl E3 Ubiquitin-Ligase ausweist (72). Damit wird dem pY1112 eine wichtige Funktion beim Rezeptor-Abbau zugeschrieben (9), was der Signaltransduktion von c-erbB2 entgegenwirkt (117). Bei BT474 hingegen wird dieser Weg über die Phosphorylierung von Y1112 nicht verwendet, wodurch dieser inhibitorische Effekt von EGF ausbleibt und sich dieser Wachstumsfaktor als Stimulus für die Zellproliferation darstellt.

Der Herceptin-induzierte Transfer von Zellen in die G0-Phase wird bei BT474 und SK-BR-3 vielmehr über die Tyrosinreste 877 - mit dessen postulierter Funktion bei der Regulation der c-erbB2 Proteinkinase-Aktivität (24) - und 1248 vermittelt (vgl. 5.2.2). Dabei ist bei BT474 der Herceptin-vermittelte Anstieg der Phosphorylierung unabhängig von der An- oder Abwesenheit von EGF oder HRG (Abb. 23 und Abb. 25). Die unterschiedliche Sensitivität von BT474 gegenüber Herceptin bei der Kombination mit EGF im Vergleich zu HRG/Herceptin kommt damit nur auf der Ebene der Zellproliferation zum Ausdruck.

Bei SK-BR-3 vermittelt die alleinige Applikation von Herceptin eine Phosphorylierung am Y1248 des c-erbB2, die in etwa das doppelte Niveau relativ zu den Kombinationen von EGF bzw. HRG mit Herceptin erreicht. Dies geht einher mit dem stärksten, für diese Zelllinie beobachteten inhibitorischen Effekt auf die Zellproliferation. Wie auch bei BT474 spiegelt sich die Feinregulation des proliferativen Verhaltens von SK-BR-3 bei kombinierter Wachstumsfaktor/Herceptin-Applikation nicht in signifikanten Unterschieden in der Phosphorylierung von Y877 oder Y1248 des c-erbB2 wider.

An der Signaltransduktion von proliferativ wirkendem EGF (BT474) und HRG (BT474 und SK-BR-3) ist keine der drei untersuchten Tyrosinreste des c-erbB2 beteiligt. Trotzdem ist eine HRG-vermittelte Signaltransduktion über die Rekrutierung des c-erbB2 durch den HRG-Rezeptor c-erbB3 möglich: Da c-erbB3 eine defekte Kinase-Aktivität aufweist (vgl. 1.1.1) und eine Phosphorylierung der erbB-Rezeptoren ausschließlich *in trans*, d. h. gegenseitig stattfindet (vgl. 1.1.1) (51,55), ist nach Literaturdaten das Ausbleiben einer HRG-induzierten Phosphorylierung am c-erbB2 und EGFR (vgl. EGFR-Phosphorylierung) durch eine unidirektionale Phosphorylierung des c-erbB3 durch den Dimerisierungspartner begründet (56,143). Damit kann - wie auch von Campiglio *et al.* beschrieben - eine funktionelle

Aktivierung von c-erbB3 durch HRG auch ohne eine vermehrte Tyrosin-Phosphorylierung am c-erbB2 erfolgen (13), und die c-erbB2/c-erbB3 Heterointeraktion, als der bei der mitogenen Signaltransduktion potenteste Dimer, die auch in dieser Arbeit bestätigte, effektive Stimulation der Proliferation durch HRG bewirken (Abb. 20) (18). Dass die c-erbB2/c-erbB3 Homodimerisierung eine essentielle Interaktion bei der Vermittlung von malignem Wachstum darstellt, wurde kürzlich auch von Holbro *et al.* beschrieben (49). Die in der vorliegenden Arbeit herausgestellten Unterschiede in der Rezeptor-Aktivierung bei BT474 und SK-BR-3 ergänzen diese Beobachtung dahingehend, dass auch der koexprimierte EGFR die Effekte der Liganden entscheidend mitbestimmt.

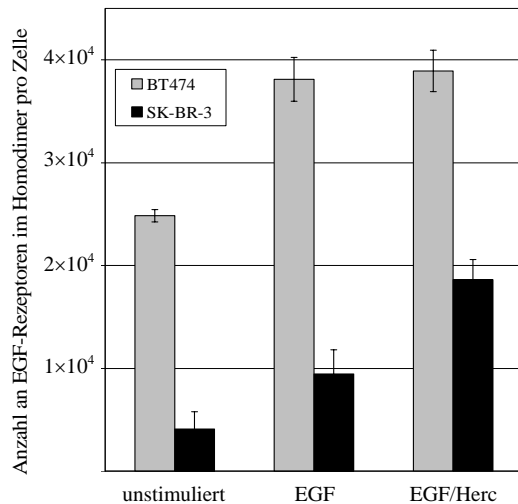
### 6.3 WACHSTUMSFAKTOR- UND HERCEPTIN-ABHÄNGIGE ERBB-REZEPTOR-INTERAKTION

Die durch Ligandenbindung induzierte laterale Interaktion der erbB-Rezeptoren ist das initiale Ereignis bei der Signaltransduktion eines extrazellulären Stimulus über die Zellmembran ins Innere der Zelle. Diese gegenseitige Interaktion der erbB-Rezeptoren kann mit der FRET-Technik in der Durchflusszytometrie gemessen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode auf die beiden c-erbB2 überexprimierenden Zelllinien BT474 und SK-BR-3 angewandt und die Wachstumsfaktor- und Herceptin-abhängige Homo- und Heterodimerisierung von EGFR und c-erbB2 auf die Bedeutung der differentiellen Koexpression des EGFR hin untersucht.

Während sich die Abhängigkeit der c-erbB2 Homodimerisierung von Wachstumsfaktor- und/oder Herceptin-Stimulierung bei BT474 und SK-BR-3 gleicht (Abb. 28), zeigte sich für die EGFR Homo- und die EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung im Vergleich der beiden Zelllinien ein jeweils unterschiedliches Muster an Liganden-induzierter Rezeptor-Interaktion (Abb. 26 und Abb. 27). In Abb. 30 ist dies in einem Überblick zusammengefasst.

#### 6.3.1 EGFR Homodimerisierung

Bei BT474, die eine geringe EGFR-Expression aufweisen, bewirkt die Stimulation mit EGF wie bei SK-BR-3, die den EGFR auf einem höheren Level exprimieren, eine Verstärkung der EGFR Homodimerisierung (Abb. 26 und Abb. 30 A und B), wobei Herceptin bei BT474 keinen zusätzlichen Effekt zeigt. Bei SK-BR-3 hingegen vergrößert Herceptin den durch EGF vermittelten Effekt einer vermehrten EGFR Homointeraktion. Herceptin kann damit ausschließlich bei einem hohen EGFR-Gehalt einen positiven Einfluss auf das Ausmaß der EGF-vermittelten EGFR Homodimerisierung nehmen.



**Abb. 29: Absolute Zahl von EGF-Rezeptoren im Homodimer pro Zelle bei BT474 (grau) und SK-BR-3 (schwarz) für unbehandelte, EGF- bzw. EGF/Herceptin-stimulierte Zellen. Für BT474 wurden  $7,6 \times 10^4$  und für SK-BR-3  $2,2 \times 10^5$  EGF-Rezeptoren pro Zelle angenommen (11) und diese Werte mit E/100 aus Abb. 26 multipliziert.**

Darüber hinaus wird bei einem Vergleich der Werte für die Energietransfer-Effizienz bei der EGFR Homodimerisierung der beiden Zelllinien deutlich, dass für unbehandelte und für EGF- und EGF/Herceptin-stimulierte SK-BR-3 ein geringerer Prozentsatz der membranständigen EGF-Rezeptoren als Homodimere vorliegt (Abb. 26). Bezieht man die Werte für die Energietransfer-Effizienz aus Abb. 26 auf die absolute Rezeptorzahl für BT474 bzw. SK-BR-3 (Abb. 12), so erhält man die Anzahl der EGF-Rezeptoren, die bei einer einzelnen Zelle in Homodimeren assoziiert sind (Abb. 29). Dieses Ausmaß der absoluten EGFR Homodimerisierung bleibt bei SK-BR-3 jedoch ebenfalls unter dem von BT474.

Entgegen den Erwartungen korreliert damit der Expressionslevel des EGFR invers mit dem Niveau der EGFR Homodimerisierung. In Übereinstimmung mit diesen Daten zeigen Nagy *et al.* mit der FRET-Technik für die den EGFR überexprimierende Cervixkarzinom-Zelllinie A431 eine nur geringe basale EGFR Homodimerisierung im Bereich von 2% (90). Die Ursachen für dieses Dimerisierungsverhalten sind noch nicht untersucht.

### 6.3.2 EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung

Bei BT474 geht die Stimulation der Proliferation durch EGF einher mit einer Erhöhung der EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung (Abb. 27 und Abb. 30 A). Dies bestätigt Daten von Energietransfer-Messungen aus der Literatur, die bei dieser Zelllinie ebenfalls eine EGF-induzierte EGFR/c-erbB2 Interaktion beschreiben (11). Des Weiteren wird diesem Rezeptorpaar mit c-erbB2 als bevorzugten Interaktionspartner von EGF-gebundenem EGFR die dominierende Rolle bei einer Vermittlung eines proliferativen Stimulus zugeschrieben (13,43). In Übereinstimmung dazu steht auch der anti-proliferative Effekt von EGF bei SK-BR-3, der mit einer verringerten EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung korreliert (Abb. 27 und Abb. 30 B). Der proliferative Respons auf die Applikation von EGF wird damit über die Änderung des Levels der EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung bestimmt, die wiederum je nach Koexpressionslevel des EGFR unterschiedlich ausfällt, d. h. bei BT474 (geringe EGFR-Koexpression) vermehrt und bei SK-BR-3 (hohe EGFR-Koexpression) verringert wird.

Die Heterointeraktion EGFR/c-erbB2 verhält sich bei BT474 und SK-BR-3 nach Applikation von EGF/Herceptin ebenfalls unterschiedlich (Abb. 30 C und D). Bei SK-BR-3 unterbindet die im Versuchsprotokoll vorgesehene Vorinkubation mit Herceptin (vgl. 4.1.2) die Wirkung von EGF auf die EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung, die sich im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle unverändert zeigt (Abb. 27). Bei BT474 hingegen ist die Wirkung der Kombination EGF/Herceptin auf die EGFR/c-erbB2 Heterointeraktion identisch mit der Applikation von EGF alleine, d. h. Herceptin nimmt bei BT474 und einem geringen EGFR-Koexpressionslevel keinen Einfluss auf diese Rezeptor-Interaktion (Abb. 30 C).

Die schon bei der EGFR Homodimerisierung beschriebene inverse Korrelation des EGFR-Expressionslevels mit der Rezeptor-Interaktion trifft auch für die EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung zu: Unstimulierte SK-BR-3 Zellen erreichen mit  $E = 4,9\%$  nur 24,5% des Niveaus der basalen EGFR/c-erbB2 Heterointeraktion von BT474 ( $E = 20\%$ ). Der prozentuale Wachstumsfaktor- und Herceptin-induzierte Anstieg der Energietransfer-Effizienz ist jedoch bei SK-BR-3 stets stärker ausgeprägt als bei BT474. Diese Daten unterstreichen die Bedeutung der differentiellen EGFR-Koexpression im Hintergrund der c-erbB2-Überexpression, die sowohl auf das basale als auch das Wachstumsfaktor- und Herceptin-induzierte Muster der Rezeptor-Interaktionen Einfluss nimmt.

Als Ursache für die Zelllinien-spezifische Reaktion von BT474 und SK-BR-3 auf EGF und/oder Herceptin bei der EGFR Homo- und EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung kommen auch Unterschiede in der Produktion und Sekretion von Liganden der EGF-Familie in Frage, die von Zelllinien in das Medium abgegeben werden und zur autokrinen Stimulation der Rezeptor-Dimerisierung mit EGFR-Beteiligung führen können (14,124). Dabei wird z. B. die Sekretion des EGFR-Liganden  $TGF\alpha$  häufig beobachtet (109,118), wodurch sich wiederum das Niveau der EGFR-Expression als entscheidend für das Ausmaß des Liganden-Effekts darstellt. Des Weiteren spielt auch eine evtl. unterschiedliche, vom erbB-Koexpressionsmuster abhängige Verteilung der erbB-Rezeptoren auf der Zelloberfläche für die Begünstigung von bestimmten Rezeptor-Interaktionspaaren eine Rolle. So wird durch Nagy *et al.* ein dynamisches, d. h. durch die Applikation der Liganden EGF, HRG oder Herceptin induziertes, verstärktes *Clustering* von c-erbB2 Rezeptoren in definierten Lipid-Mikrodomänen, sog. *lipid rafts*, auf der Zelloberfläche von SK-BR-3 beschrieben, was je nach lokaler Konzentration der Mitglieder der erbB-Rezeptoren ein unterschiedliches Homo- und Heterodimerisierungsmuster begünstigen kann (89). Der nur indirekt durch das an c-erbB2 bindende Herceptin mögliche Einfluss auf die Assoziation von EGF-induzierten EGFR-Homodimeren bei SK-BR-3 (Abb. 26) ist somit sowohl durch eine Verschiebung von

Interaktionsgleichgewichten als auch durch eine selektive Akkumulation von Rezeptoren in derartigen Lipid-Mikrodomänen möglich (139).

Die EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung bei BT474 und SK-BR-3 wird durch den für c-erbB3 und c-erbB4 spezifischen Wachstumsfaktors HRG, durch die Applikation von Herceptin und der Kombination HRG/Herceptin nicht signifikant beeinflusst (Abb. 27). Der in Abb. 20 gezeigte, äußerst potente stimulatorische Effekt von HRG auf die Zellproliferation kann jedoch nur durch die Interaktion der HRG-Rezeptoren c-erbB3 und c-erbB4 untereinander oder/und mit EGFR oder c-erbB2 vermittelt werden (23,101). Da sich mit der Überexpression des c-erbB2 ( $7 \times 10^5$  Rezeptoren pro Zelle bei BT474 und SK-BR-3) und der in beiden Zelllinien niedrig exprimierten c-erbB3 und c-erbB4 Rezeptoren ( $1 \times 10^4$  bzw.  $1,1 \times 10^4$  Rezeptoren pro Zelle) (11) ein hohes Verhältnis von c-erbB2 zu c-erbB3 bzw. c-erbB4 ergibt, kann eine Rekrutierung von c-erbB2 in Heterodimere mit HRG-Rezeptoren somit nur einen äußerst geringen, mit der hier verwendeten FRET-Technik nicht messbaren Einfluss auf die Dimerisierungsgleichgewichte haben. Diese Heterointeraktion von HRG-Rezeptoren mit EGFR und c-erbB2 folgt dabei einer strikten Hierarchie (137) mit c-erbB2 als bevorzugten Heterodimerisierungspartner (43). Die Rekrutierung des EGFR nach HRG-Stimulation kann deshalb als weniger bedeutend eingestuft werden. Dies wird durch Daten von Graus-Porta *et al.* unterstützt, die eine EGFR/c-erbB3 oder EGFR/c-erbB4 Heterodimerisierung nur bei Abwesenheit von c-erbB2 nachweisen konnten (43). Dass jedoch auch eine derart geringe absolute Zahl an möglicher Liganden-induzierter Rezeptor-Interaktion eine überaus effektive Signaltransduktion bewirken kann, belegt der äußerst potente stimulatorische Effekt von HRG auf die Zellproliferation von sowohl BT474 als auch SK-BR-3 (Abb. 20). Dies spiegelt die besondere Bedeutung der erbB-Koexpression auch in Gegenwart der Überexpression eines erbB-Rezeptors wie c-erbB2 wider.

### 6.3.3 C-erbB2 Homodimerisierung

Die Applikation von Herceptin führt bei der c-erbB2 Homodimerisierung bei beiden untersuchten Mammakarzinom-Zelllinien unabhängig von der Anwesenheit der Wachstumsfaktoren EGF und HRG zu einer signifikanten Erhöhung der Energietransfer-Effizienz (Abb. 28 und Abb. 30). Bislang haben sich in der Literatur veröffentlichte Untersuchungen mit der Western-Blot Technik aufgrund von technischen Limitierungen hauptsächlich darauf konzentriert, den Effekt von Herceptin auf die Heterodimerisierung von erbB-Rezeptoren zu untersuchen. Nahta *et al.* erbrachten mit dieser Methode hinsichtlich der EGFR/c-erbB2 und c-erbB2/c-erbB3 Dimerisierung den Nachweis, dass Herceptin die Interaktion zwischen

diesen erbB-Rezeptorpaaren nicht unterbindenden kann (91). In der vorliegenden Arbeit konnte mit der FRET-Technik gezeigt werden, dass Herceptin bei c-erbB2-Überexpression nicht nur die c-erbB2 Homodimerisierung nicht behindert, sondern - als Bestätigung der entsprechenden Hypothese von Sliwkowski *et al.* (117) - die Homodimerisierung des c-erbB2 verstärkt (Abb. 28 und Abb. 30 C - H). Der Einfluss von Herceptin ist dabei unabhängig vom EGFR-Koexpressionslevel und der An- oder Abwesenheit der Wachstumsfaktoren EGF und HRG. Dies zeigt sich in Übereinstimmung zu Literaturdaten zur Kristallstruktur des c-erbB2 mit dem Fab-Fragment des Herceptin-Antikörpers, für dessen Bindungsstelle am c-erbB2 Rezeptor ein Abschnitt identifiziert wurde, der nahe der Transmembrandomäne liegt, und damit eine Dimerisierung der Rezeptoren sterisch nicht behindert (16). Eine positive Wirkung auf die c-erbB2 Homodimerisierung wird durch die in Kapitel 6.3.2 beschriebenen Daten von Nagy *et al.* unterstützt, die bei SK-BR-3 Zellen unter anderem auch für die Applikation von Herceptin ein verstärktes *Clustering* von c-erbB2 in *lipid rafts* fanden (89). Die damit verbundene, höhere lokale Konzentration von c-erbB2 könnte eine vermehrte c-erbB2 Homodimerisierung begünstigen. Die agonistische Wirkung des Herceptin (Abb. 22) (110) wird damit über eine vermehrte c-erbB2 Homodimerisierung vermittelt (Abb. 28), die über die Aktivität der potenten Kinase Domäne des c-erbB2 (89) die Phosphorylierung dieses Rezeptors an den Tyrosinen 877 und 1248 bewirkt (Abb. 23, Abb. 25 und Abb. 30).

Eine messbare Änderung der c-erbB2 Homodimerisierung tritt nur in Gegenwart von Herceptin, nicht jedoch bei alleiniger Applikation von EGF oder HRG auf. Dessen Ursache kann, wie für die EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung beschrieben, in dem jeweils hohen Verhältnis von c-erbB2 zu HRG-Rezeptoren bzw. zum EGFR gesehen werden (vgl. 6.3.2). Die differenzielle EGFR-Koexpression bei BT474 und SK-BR-3 hat somit nur einen Effekt auf Rezeptor-Interaktionen mit EGFR-Beteiligung. Von einem hohen EGFR-Koexpressionslevel abhängig, und damit spezifisch für SK-BR-3, ist hingegen der in Abb. 26 und Abb. 27 gezeigte, sich nur bei gleichzeitiger EGF-Applikation manifestierende Einfluss von Herceptin auf die EGFR Homo- und die EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung.

#### 6.4 KORRELATION DER ZELLPROLIFERATION MIT REZEPTOR-INTERAKTION UND -AKTIVIERUNG

Die erbB-Rezeptoren sind der Ausgangspunkt einer komplexen intrazellulären Signaltransduktion, die es im Zuge der Signaldiversifizierung einer Zelle ermöglicht, auf verschiedenste Stimuli mit proliferativen und inhibitorischen Signalen spezifisch zu reagieren (111). Die laterale Signaltransduktion der erbB-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, d. h. die Liganden-



induzierte erbB-Rezeptor-Interaktion und -Aktivierung, bildet dabei die Basis dieser Komplexität bei der Weitergabe eines Signals in die Zelle. Damit soll ein tiefer gehendes Verständnis dieses initialen Systems der erbB-Rezeptoren auf der Ebene der Zellmembran dazu beitragen, anhand von bestimmten Liganden-induzierten Interaktions- und Aktivierungsmustern eine Vorhersage des zellulären Respons zu ermöglichen.

Der klinische Nutzen des bisherigen Kenntnisstands über diese Rezeptorfamilie für Diagnostik und Therapie zeigt, dass es sinnvoll ist, den Fokus auf die initialen Ereignisse der Signaltransduktion an der Zellmembran, d. h. auf die erbB-Rezeptoren selbst zu richten, und damit die Redundanz und die Mechanismen zur gegenseitigen Kompensation der verschiedenen intrazellulären Signalwege zu umgehen. Ein besseres Verständnis des Systems der erbB-Rezeptoren in Bezug auf Liganden-induzierte Interaktion, Aktivierung und Zellproliferation ist somit die Voraussetzung dafür, die Gründe für ein fehlendes Ansprechen auf eine erbB-spezifische Tumorthherapie zu erkennen und durch eine Optimierung der Therapie die Responsrate verbessern zu können (vgl. 1.2.4 und 1.3) (95).

#### *6.4.1 Der Effekt von Wachstumsfaktoren*

Ein Überblick über die Liganden-induzierten Effekte bei BT474 und SK-BR-3 ist in Abb. 30 zusammengestellt. Diese Abbildung zeigt in A, dass die Stimulierung von BT474 mit EGF zu einer verstärkten EGFR Homo- und EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung und einer vermehrten EGFR-Phosphorylierung am Tyrosinrest 1173 führt und in einem proliferativen Respons resultiert.

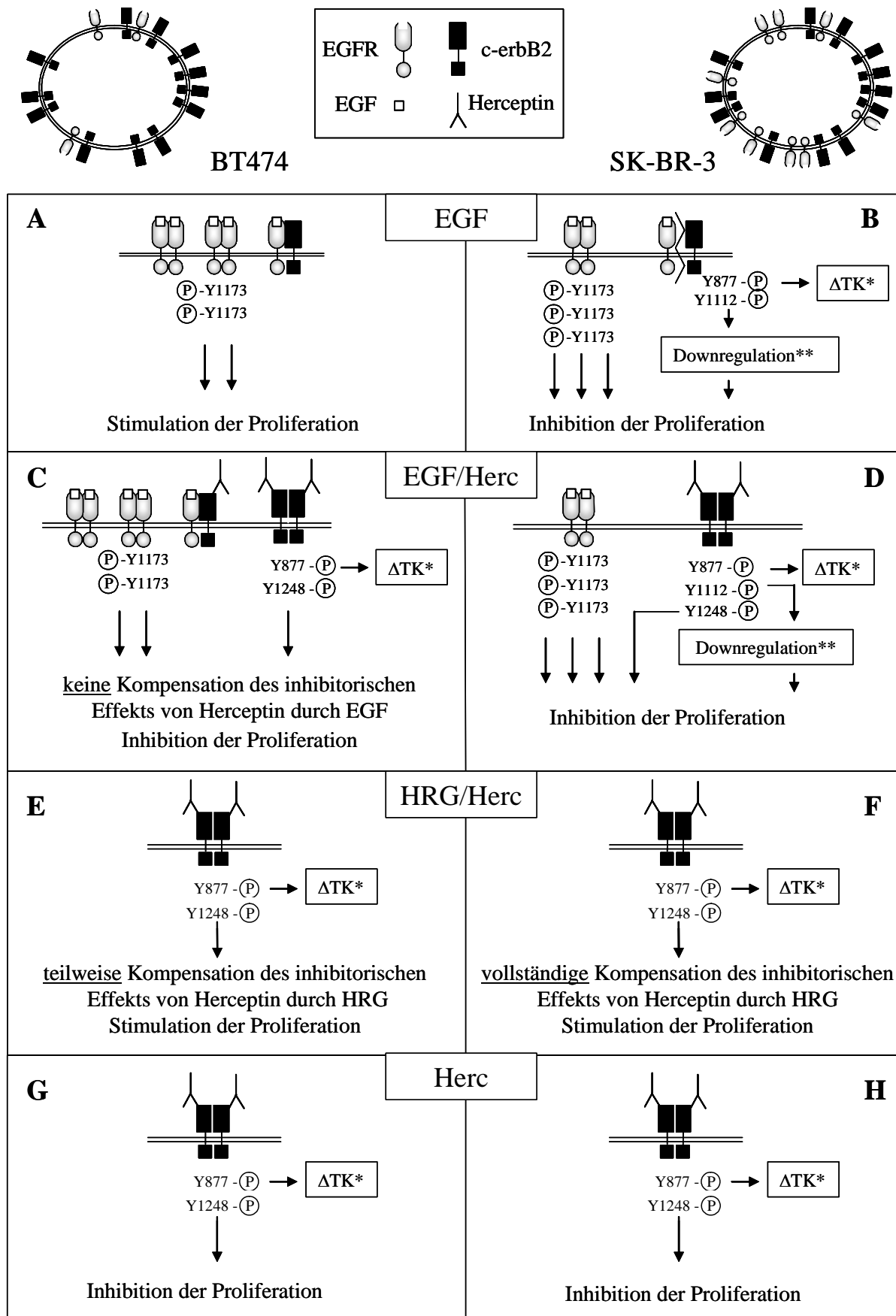
Beim anti-proliferativen Effekt des EGF auf SK-BR-3 (Abb. 30 B) wird ebenfalls eine verstärkte EGFR Homodimerisierung beobachtet, die jedoch unter dem bei BT474 gemessenen Niveau bleibt. Die inhibitorische Wirkung von EGF auf die Proliferation von SK-BR-3 wird von einer verminderten EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung begleitet. Trotz dieser Unterschiede in den EGF-vermittelten Rezeptor-Interaktionen und beim proliferativen Respons bei BT474 und SK-BR-3, bewirkt EGF bei beiden Zelllinien in etwa das gleiche Ausmaß an Phosphorylierung am Tyrosin 1173, wenn jeweils auf eine gleiche Anzahl an Rezeptoren Bezug genommen wird. Die hohe EGFR-Expression bei SK-BR-3 und damit eine im Vergleich zu BT474 höhere Zahl von zur Signaltransduktion zur Verfügung stehenden, Y1173-phosphorylierten EGF-Rezeptoren pro Zelle (Abb. 30 B) ist - wie in Kapitel 6.2 beschrieben - als ursächlich für den inhibitorischen Effekt von EGF auf die Zellproliferation von SK-BR-3 zu sehen (38). Wie bei SK-BR-3 nach EGF-Behandlung eine im Vergleich zu BT474 geringere Rezeptor-Interaktion zu einem bei beiden Zelllinien fast identischen Niveau an EGFR-Phosphorylierung pro Rezeptor führen kann, bleibt dabei noch unbeantwortet und

verlangt die Einbeziehung von c-erbB3 und c-erbB4 in weitere Untersuchungen zur Rezeptor-Interaktion und -Aktivierung.

Des Weiteren verstärkt die Applikation von EGF bei SK-BR-3 eine Phosphorylierung an den Tyrosinen 877 und 1112 des c-erbB2. Dies zeigt, dass die inhibitorische Wirkung von EGF neben einer vermehrten Signalweiterleitung über den EGFR zusätzlich über die Phosphorylierung des c-erbB2 vermittelt wird.

Eine EGF-abhängige Phosphorylierung von c-erbB2 erfolgt - nach heutigem Kenntnisstand - nach lateraler Interaktion mit Liganden-gebundenem EGFR. Die hier vorliegenden Daten zeigen jedoch, dass auch bei einer Verringerung der EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung eine EGF-vermittelte Phosphorylierung des c-erbB2 stattfinden kann. Damit ist eine EGF-induzierte Aktivierung des c-erbB2 nicht (nur) von der Quantität der EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung abhängig. Für die Induktion einer vermehrten Phosphorylierung eines erbB-Rezeptors kommen neben der Liganden-induzierten lateralen Interaktion weitere Mechanismen in Frage. Zum Einen sind durch erbB-Rezeptoren oder heterolog aktivierte Proteinkinasen wie z. B. die Src-Kinase an einer aktiven Phosphorylierung der erbB-Rezeptoren beteiligt. Außerdem gilt die Inaktivierung von negativen Regulatoren wie z. B. von Protein-Phosphatasen als Ursache für eine vermehrte Rezeptor-Phosphorylierung (150). Die an das Tyrosin 1173 des EGFR bindende Protein-Phosphatase Shp1 (vgl. 5.2.1 und 6.2) stünde im Zuge einer verminderten EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung nicht mehr zur Dephosphorylierung des c-erbB2 zur Verfügung und könnte zu dem hier beobachteten positiven Effekt auf die Phosphorylierung von c-erbB2 an den Tyrosinen 877 und 1112 beitragen.

HRG stellte sich für beide Zelllinien als ein starker Stimulus der Zellproliferation dar, induziert jedoch keine Änderungen von hier untersuchten Rezeptor-Interaktionen oder Tyrosin-Phosphorylierungen.



**Abb. 30: Korrelation von Liganden-abhängiger Rezeptor-Interaktion, -Aktivierung und Zellproliferation.** Schematisch ist für je eine BT474 und SK-BR-3 Zelle die c-erbB2-Überexpression und die EGFR-Koexpression, die bei SK-BR-3 im Vergleich zu BT474 ein dreifaches Niveau erreicht, dargestellt.

- A:** Die Stimulation von BT474 Zellen mit EGF führt zu einer verstärkten EGFR Homo- und EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung, einer EGFR-Phosphorylierung am Y1173 und zu einer Stimulation der Zellproliferation.
- B:** Die Behandlung von SK-BR-3 Zellen mit EGF bewirkt einen Anstieg des Levels der EGFR Homodimerisierung, eine Verringerung der EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung und eine verstärkte Phosphorylierung am Y1173 des EGFR und am Y877 und Y1112 des c-erbB2. EGF inhibiert die Zellproliferation von SK-BR-3.
- C:** BT474 Zellen zeigen mit EGF/Herceptin eine verstärkte EGFR und c-erbB2 Homo- und EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung, eine erhöhte Phosphorylierung des EGFR am Y1173 und des c-erbB2 an den Tyrosinen 877 und 1248. Der anti-proliferative Effekt von Herceptin wird durch EGF nicht kompensiert, d. h. es kommt zu einer Inhibition der Zellproliferation.
- D:** Die Applikation von EGF/Herceptin vermittelt bei SK-BR-3 eine verstärkte EGFR und c-erbB2 Homodimerisierung, eine Phosphorylierung des Tyrosinrests 1173 des EGFR und der Tyrosine 877, 1112 und 1248 des c-erbB2. Der Effekt auf die Zellproliferation ist inhibitorisch. Die EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung bleibt im Vergleich zu unbehandelten Zellen unverändert und wurde deshalb nicht in die Abbildung aufgenommen.
- E-H:** Die Zellbehandlung mit HRG/Herceptin oder Herceptin bewirkt eine verstärkte c-erbB2 Homodimerisierung und Phosphorylierung an den Tyrosinresten 877 und 1248.
- E:** Bei BT474 wird der inhibitorische Effekt von Herceptin durch HRG teilweise kompensiert, was im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu einer stimulierten Zellproliferation führt.
- F:** HRG-stimulierte SK-BR-3 Zellen sind insensitiv gegenüber dem anti-proliferativen Einfluss von Herceptin. Es kommt bei Applikation von HRG/Herceptin zu einer analogen Stimulation der Proliferation wie für HRG alleine (nicht in Abb. 30 enthalten).
- G/H:** Für BT474 (G) und SK-BR-3 (H) wirkt Herceptin inhibierend auf die Zellproliferation.

**Y:** Tyrosin, **P:** Phosphorylierung, **ΔTK:** Regulation der Tyrosin-Kinase-Aktivität von c-erbB2, **\***: (24), **\*\*:** (72). Ausführlichere Erklärungen zu den bislang bekannten Funktionen der einzelnen Tyrosinreste sind in Kapitel 5.2.1 für den Tyrosinrest 1173 des EGFR und in Tab. 10 für die Tyrosinreste des c-erbB2 zu finden.

#### 6.4.2 Der Effekt von Herceptin und Wachstumsfaktoren in kombiniertem Einsatz

Herceptin unterbindet bei BT474 den stimulatorischen Effekt von EGF auf die Zellproliferation (Abb. 30 C), wozu die Verminderung der durch EGF stimulierten EGFR-Phosphorylierung am Y1173 (Abb. 22 A) einen Beitrag leisten könnte. Da sich dieser Unterschied in der EGFR-Aktivierung jedoch als nicht signifikant darstellte, ist dies lediglich als ein Hinweis dafür zu sehen, dass Herceptin bei BT474 die EGFR-Phosphorylierung durch EGF unterbinden und durch eine damit verbundene verminderte Signaltransduktion zur Vermittlung eines anti-proliferativen Respons beitragen kann. Im Unterschied dazu wird bei SK-BR-3, d. h. bei hoher EGFR-Expression, die EGF-induzierte Aktivierung dieses Rezeptors durch Herceptin nicht beeinflusst (Abb. 30 B und D).

Das Ausmaß der anti-proliferativen Wirkung der Kombination EGF/Herceptin auf SK-BR-3 ist in den anti-BrdU Messungen nicht von dem des EGF zu unterscheiden (Abb. 20 B). Damit ist kein additiver oder synergistischer Effekt dieser beiden, einzeln bereits inhibitorisch auf

die Zellproliferation von SK-BR-3 wirkenden Liganden zu erkennen. EGF, mit dessen spezifischen Effekten auf die Rezeptor-Aktivierung, kann folglich bei der hohen EGFR-Expression von SK-BR-3 als dominierend bei der Vermittlung des anti-proliferativen Respons angesehen werden.

Die durch EGF-Applikation verstärkte EGFR Homodimerisierung bei SK-BR-3 steigt durch die Kombination von EGF mit Herceptin weiter an. Dem steht der im Vergleich zu EGF-stimulierten Zellen (EGF vermindert die EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung, vgl. Abb. 28) erhöhte Level an EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung gegenüber, der einen entgegengesetzten Effekt von EGF und Herceptin auf die Heterointeraktion andeutet. Die Verschiebung dieser Homo- und Heterodimerisierungs-Gleichgewichte in verschiedene Richtungen kann für den ausbleibenden Nettoeffekt auf die Proliferation bei Kombination von EGF/Herceptin gegenüber der alleinigen Applikation von EGF verantwortlich sein.

Das bei BT474 durch EGF-Behandlung erhöhte Niveau an EGFR Homo- und EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung wird hingegen durch Herceptin nicht beeinflusst (Abb. 30 A und C). Vielmehr vermittelt eine verstärkte c-erbB2 Homodimerisierung und c-erbB2-Phosphorylierung an den Tyrosinresten 877 und 1248 die anti-proliferative Wirkung von Herceptin bei BT474 (Abb. 30 C/G) und auch SK-BR-3 (Abb. 30 D/H).

Das Ausmaß der Herceptin-induzierten c-erbB2 Homointeraktion und Aktivierung ist bei beiden Zelllinien unabhängig von der gleichzeitigen Präsenz der Wachstumsfaktoren EGF und HRG. Eine Ausnahme bildet SK-BR-3, bei der bei alleiniger Applikation von Herceptin die stärkste Phosphorylierung am Y1248 des c-erbB2 auftritt. Dies geht bei SK-BR-3 mit dem ausgeprägtesten inhibitorischen Effekt der Zellbehandlung unter den verwendeten Kombinationen von Liganden einher.

Das bei SK-BR-3 geringere Niveau der Aktivierung am Y1248 des c-erbB2 bei HRG/Herceptin-Stimulation im Vergleich zu Herceptin-Applikation (Abb. 25 B) korreliert mit einer durch HRG aufgehobenen anti-proliferativen Wirkung von Herceptin (Abb. 30 F). Bei BT474 kann HRG den inhibitorischen Effekt von Herceptin lediglich vermindern (Abb. 30 E), was diese Zelllinie als sensitiver gegenüber Herceptin darstellt. Der Mechanismus, nach dem HRG diesen Effekt vermittelt, kann nicht geklärt werden, da eine HRG-induzierte Phosphorylierung oder Interaktion der in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren ausbleibt. In der Literatur finden sich jedoch hierzu Daten über eine Rolle der HRG-Rezeptoren c-erbB3 und c-erbB4, die nach Bindung von HRG bevorzugt Heterodimere mit c-erbB2 bilden, wodurch besonders durch das Interaktionspaar c-erbB2/c-erbB3 das Zellwachstum äußerst effektiv stimuliert wird (18,49).

Die für die Stimulation mit verschiedenen Kombinationen aus EGF, HRG und Herceptin für BT474 und SK-BR-3 ermittelten Daten bestätigen, dass eine differentielle EGFR-Koexpression im Hintergrund von überexprimiertem c-erbB2 ein jeweils spezifisches Homo- und Heterodimerisierungsmuster des EGFR und c-erbB2 vermittelt, was je nach dem induzierten Spektrum an Phosphorylierung an den Tyrosinresten des EGFR und c-erbB2 zu einer unterschiedlichen Antwort im Hinblick auf die Proliferation führen kann (Abb. 30) (43,94,95).

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegenden Daten zeigen, dass im *in vitro* Zellkultursystem einer c-erbB2-Überexpression ein unterschiedliches Liganden-vermitteltes Wachstumsverhalten auf spezifisch induzierte Rezeptor-Interaktionen und -Aktivierungen zurückzuführen ist und dies wiederum durch den EGFR-Koexpressionslevel determiniert wird. Damit konnten für einen Teilbereich des komplexen Systems der erbB-Rezeptoren die Mechanismen der initialen, auf der Zellmembran stattfindenden Signaltransduktion besser verstanden und in Verbindung mit dem proliferativen Respons gebracht werden.

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Arbeit folgende Daten erhoben werden.

- Für die beiden, den c-erbB2 Rezeptor überexprimierenden Mammakarzinom-Zelllinien BT474 und SK-BR-3 wurde gezeigt, dass sowohl das durch die Wachstumsfaktoren EGF und HRG und durch Herceptin induzierte proliferative Verhalten als auch die Signaltransduktion über die Zellmembran einer Zelle nicht alleine durch eine c-erbB2-Überexpression, sondern ebenso durch den Koexpressionslevel des EGFR (SK-BR-3: hohe EGFR-Expression; BT474: geringe EGFR-Expression) definiert wird.
- Herceptin wirkt bei BT474 und SK-BR-3 inhibitorisch auf die Zellproliferation, indem es die Zellzyklusdauer verlängert und eine Fraktion an Zellen in die G0-Phase überführt. Dabei tritt bei BT474 ein höherer Anteil an Zellen aus dem Zellzyklus aus, was diese Zelllinie als sensibler gegenüber Herceptin ausweist.
- Die inhibitorische Wirkung von Herceptin kann bei SK-BR-3 durch den Wachstumsfaktor HRG vollständig aufgehoben, bei BT474 hingegen lediglich vermindert werden.
- Ein geringer EGFR-Koexpressionslevel korreliert sowohl in An- als auch in Abwesenheit von HRG mit einer gesteigerten Sensitivität gegenüber der anti-proliferativen Wirkung von Herceptin.
- Ein inhibitorischer Effekt von EGF auf die Zellproliferation wurde ausschließlich für SK-BR-3, d. h. bei hoher EGFR-Expression beobachtet. Der Level an EGFR-Koexpression im Hintergrund der c-erbB2-Überexpression ist damit bestimmend für den proliferativen oder anti-proliferativen Respons einer Zelle.
- Die Analyse der Rezeptor-Aktivierung zeigte für beide Zelllinien eine durch EGF induzierbare Phosphorylierung am Tyrosinrest 1173 des EGFR. Die Berücksichtigung der höheren EGFR-Expression bei SK-BR-3 im Vergleich zu BT474 ergibt einen etwa vierfachen Level an Gesamt-EGFR[pY1173] pro Zelle und damit mehr Bindungsstellen für Adaptor- und Signalproteine einer nachgeschalteten Signaltransduktion.

- Ein anti-proliferativer Effekt wird über eine Phosphorylierung des c-erbB2 vermittelt. EGF verstärkt die Phosphorylierung an den Tyrosinen 877 und 1112 des c-erbB2, Herceptin hingegen an den Tyrosinen 877 und 1248. Mit Ausnahme der alleinigen Applikation von Herceptin bei SK-BR-3, das bei dieser Zelllinie die stärkste, unter allen Stimuli gemessene Phosphorylierung am Y1248 des c-erbB2 bewirkt, ist die Herceptin-induzierte Phosphorylierung am c-erbB2 unabhängig von der gleichzeitigen Anwesenheit von EGF oder HRG. Eine Phosphorylierung am Y877, Y1112 oder Y1248 des c-erbB2 ist nicht an der Signaltransduktion von proliferativ wirkendem EGF oder HRG beteiligt.
- Ein hoher EGFR-Koexpressionslevel bei SK-BR-3 korreliert mit einem geringen Ausmaß sowohl an basaler als auch an Liganden-induzierter EGFR Homo- und EGFR/c-erbB2 Heterointeraktion. Die basale EGFR Homodimerisierung kann bei SK-BR-3 durch die Applikation von EGF auf einen immer noch im Vergleich zu BT474 geringen Endwert erhöht werden, während sich die EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung weiter reduziert.
- Bei BT474 bewirken EGF und EGF/Herceptin einen identischen Anstieg bei der EGFR Homo- und EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung.
- Die agonistische Wirkung von Herceptin wird - unabhängig von der Anwesenheit von EGF oder HRG - über eine verstärkte c-erbB2 Homodimerisierung vermittelt. An der Signaltransduktion von HRG ist keine der untersuchten Rezeptor-Interaktionen beteiligt.
- Ein hohes Absolutlevel von EGF-induzierter EGFR Homo- und EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung zusammen mit einer durch EGF vermittelten Phosphorylierung am Y1173 des EGFR stehen im Zusammenhang mit einer stimulierenden Wirkung von EGF auf die Zellproliferation von BT474.
- Die Kombination aus einem hohen EGF-induzierten EGFR[pY1173]-Gehalt pro Zelle, einer Verminderung der EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung und einer verstärkten Phosphorylierung am Y877 und Y1112 des c-erbB2 ist bei SK-BR-3 mit einem anti-proliferativen Effekt von EGF assoziiert.
- Für beide Zelllinien korreliert die Herceptin-induzierte c-erbB2 Homodimerisierung mit der c-erbB2 Aktivierung/Phosphorylierung an den Tyrosinresten 877 und 1248 und wirkt inhibierend auf die Zellproliferation ein.
- Für die Untersuchung der Liganden-abhängigen Zellproliferation von BT474 und SK-BR-3 ist die BrdU/Hoechst-Quenching Technik nicht anwendbar, da der kontinuierliche BrdU-Einbau in die DNA die Zellen im Fortgang durch den Zellzyklus retardiert. Die anti-BrdU Methode als BrdU-Pulstechnik beeinflusst die Zellproliferation von BT474 und SK-BR-3 nicht und kann für Proliferationsanalysen verwendet werden.



## 8 AUSBLICK

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vitro* Untersuchungen im Zellsystem mit BT474 und SK-BR-3 konnten die Bedeutung des EGFR-Koexpressionslevels im Hintergrund der c-erbB2-Überexpression herausstellen. Dass tatsächlich ein erhöhter EGFR-Gehalt die beobachteten Unterschiede im Verhalten von SK-BR-3 gegenüber BT474 bedingt, soll zukünftig mit der siRNA-Technik validiert werden. Bei einer, mit dieser Methode erwirkten Verminderung der EGFR-Expression ist zu erwarten, dass sich das Liganden-induzierte Verhalten von SK-BR-3 Zellen an das der Zelllinie BT474 angleicht. Transfizierte Zelllinien, bei denen ausgewählte Rezeptorkombinationen in eine Zelle eingebracht werden, wären bei der Untersuchung der differentiellen Koexpression ebenfalls hilfreich. Zur Ergänzung der hier gezeigten Daten ist außerdem die Analyse der Phosphorylierung an weiteren Tyrosinresten des EGFR und c-erbB2 notwendig, um das gesamte Spektrum der Liganden-induzierten Rezeptor-Aktivierung zu erfassen. Zusätzlich kann eine Untersuchung von BT474 und SK-BR-3 auf sezernierte erbB-Liganden (z. B. TGF $\alpha$ ) zur Daten-Validierung beitragen.

Als weiterführender Schritt müssen Daten zur zeitabhängigen Induktion intrazellulärer Signalwege durch Herceptin und der Wachstumsfaktoren EGF und HRG erhoben werden, um die Unterschiede in der Wirkung von verschiedenen Kombinationen dieser Liganden besser zu verstehen. Des Weiteren kann die Untersuchung der Zellzyklusregulation auf molekularer Ebene, d. h. der regulierten Liganden-abhängigen Aktivierung, Deaktivierung, Expression und Degradation von Cyclinen, Cyclin-abhängigen Kinasen und weiterer regulatorischer Zellzyklusproteine zum Verständnis einer durch erbB-Rezeptoren vermittelten proliferativen oder anti-proliferativen Zellantwort beitragen.

Ein weiteres, erbB-Rezeptor-unabhängiges Projekt, das aus der vorliegenden Arbeit hervorgeht, kann die Untersuchung der molekularen Mechanismen des besonderen proliferativen Verhaltens von BT474 mit einer abnorm hohen S-Phase Fraktion bei kontinuierlicher Exposition gegenüber BrdU darstellen.

Für die klinische Praxis spielen die vorgestellten Daten insofern eine besondere Rolle, als von der Überexpression des c-erbB2 Rezeptors offensichtlich nicht auf das Proliferationsverhalten einer Zelle geschlossen werden kann, sondern mit der Koexpression des EGFR ein weiterer relevanter Parameter für das Wachstumsfaktor- und Herceptin-vermittelte proliferative Verhalten einer Zelle zu beachten ist. Eine Spezifizierung der Diagnose durch Berücksichtigung der EGFR/c-erbB2-Koexpression kann damit auch in der Klinik zu einer verbesserten Patientenstratifizierung für die Herceptin-Therapie des Mammakarzinoms

beitragen. Die *in vitro* Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit indizieren, dass eine geringe EGFR-Koexpression in einem Patientenkollektiv mit einem besseren Ansprechen auf eine Herceptin-Therapie korrelieren könnte. Für Tumoren mit einer neben dem überexprimierten c-erbB2 hohen EGFR-Koexpression ist möglicherweise eine entsprechend angepasste erbB-spezifische Kombinationstherapie vorzuschlagen. Damit könnte einem Einfluss von Wachstumsfaktoren, die *in vivo* autokrin, parakrin und/oder juxtakrin zur Zellstimulation führen, entgegengewirkt werden (86).

Dass ein kombiniertes spezifisches Targeting mehrerer erbB-Rezeptoren von Vorteil für den Therapieerfolg bei entsprechender erbB-Koexpression sein kann, wird derzeit in aktuellen klinischen Studien erfasst. Diese beziehen sich auf die Untersuchungen zur Wirkung von Herceptin mit TK-Inhibitoren des EGFR, wie Gefitinib oder Erlotinib, oder von bispezifischen TK-Inhibitoren wie Lapatinib, das sowohl den EGFR als auch den c-erbB2 inhibiert (vgl. 1.2.2 und 1.2.3) (12,53,87,88,151). Auch für die Kombination von erbB-Rezeptor-spezifischen Antikörpern (Herceptin plus Cetuximab bzw. Herceptin plus Pertuzumab, vgl. 1.2.3) stehen viel versprechende *in vitro* Daten zu einer synergistischen Inhibition der Proliferation von Zelllinien, die den EGFR und c-erbB2 koexprimieren, zur Verfügung (91,151).

Bei diesen neueren Therapieansätzen wird es als wichtig erachtet, die erbB-Rezeptoren auf mehreren unabhängigen Ebenen, d. h. auch über von Tumoren oder dem (Tumor-)Stroma koexprimierte Liganden (86), und über mehrere unterschiedliche Mechanismen, angreifen zu können. Dies ermöglicht es, das redundante System der intrazellulären Signalleitung der erbB-Rezeptoren äußerst effektiv zu blockieren (12). Außerdem wird eine sequentielle Anwendung der erbB-spezifischen Tumortheraeutika als Möglichkeit diskutiert, wie auf Resistenzen und Tumorprogress reagiert werden kann (116).

In zukünftigen Arbeiten ist es notwendig, die Bedeutung von c-erbB3 und c-erbB4 in *in vitro* Zellkultursystemen mit entsprechender Koexpression zu untersuchen und in klinischen Studien die Wertigkeit der Koexpression dieser beiden erbB-Rezeptoren neben dem EGFR und dem c-erbB2 Rezeptor für das Mammakarzinom herauszuarbeiten (123). Aus dem Gesamtbild der Korrelation von Liganden-induzierten Rezeptor-Interaktionen, -Aktivierungen und dem proliferativen Respons können schließlich Kriterien definiert werden, die die Patientenstratifizierung weiter optimieren können.

## 9 ANHANG

### 9.1 GERÄTEEINSTELLUNGEN DER DURCHFLUSSZYTOMETER

Im Folgenden sind die Einstellungen am FACSCalibur bzw. am FACStar<sup>PLUS</sup> für die durchflusszytometrischen DNA-Messungen (Tab. 11), die Annexin-V-Färbung (Tab. 12) und die Energietransfer-Experimente (Tab. 13) aufgeführt.

Kanal	einparam. DNA- und anti-BrdU Messung			BrdU/Hoechst-Quenching Messung		
	Verstärker-spannung [V]	Modus	Verstärkung Amper [A]	Verstärker-spannung [V]	Modus	Verstärkung Amper [A]
FSC	E-01	log	1	E-01	log	1
SSC	242	log	1	286	log	1
FL3	486	lin	2,14	610	lin	4
FL3-A	-	lin	1	-	lin	2
FL3-W	-	lin	1,49	-	lin	4
FL4	-	-	-	503	lin	1
Schwellenwert	FSC = 398			FSC = 381		

**Tab. 11:** Geräteparameter für die einparametrischen DNA-Messungen (FACSCalibur), die anti-BrdU Technik (FACSCalibur) und die BrdU/Hoechst-Quenching Technik (FACStar<sup>PLUS</sup>).

Annexin-V-Färbung				
Kanal	Verstärker-spannung [V]	Modus	Verstärkung Amper [A]	Kompensation
FSC	E-01	log	1	FL1 - 0,0% FL2
SSC	227	log	1	FL2 - 29,7% FL1
FL1	533	log	1	FL2 - 0,0% FL3
FL2	478	log	1	FL3 - 11,7% FL2
FL3	454	log	2,14	
Schwellenwert	FSC = 52			

**Tab. 12:** Geräteeinstellungen am FACSCalibur für die Analyse der Annexin-V-Färbung.

FRET Messung			
Kanal	Verstärker-spannung [V]	Modus	Verstärkung Amper [A]
FSC	E-01	lin	7,69
SSC	344	lin	1
FL2	600	log	1
FL3	800	log	1
FL4	615	log	1
Schwellenwert	FSC = 199		

**Tab. 13:** Geräteparameter am FACSCalibur für die Energietransfer-Experimente zur EGFR und c-erbB2 Homo- und EGFR/c-erbB2 Heterodimerisierung.

## 9.2 VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
3-D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
AFlex	<i>autofluorescence corrected energy transfer calculating software</i>
AG	Arbeitsgruppe
APS	Ammoniumperoxosulfat
ATTC	American Type Culture Collection
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure ( <i>bicinchoninic acid</i> )
biot.	biotinyliert
BrdU	5-Bromo-2'-desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bzw.	Beziehungsweise
c-	zellulär
Cbl	<i>Casitas B-lineage lymphoma</i>
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Cu	Kupfer
Cy3	Cyanin 3
Cy5	Cyanin 5
d. h.	das heißt
DC	Desoxycytidin
DM	dichroitischer Spiegel ( <i>dichroic mirror</i> )
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
E	Energietransfer-Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay</i>
Endkonz.	Endkonzentration
erb	<i>erythroblastosis</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Scanning</i>
FCS 2.0	<i>flow cytometry standard 2.0</i>
FKS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FL	Fluoreszenzkanal
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FSC	Vorwärtsstreulicht ( <i>forward scatter light</i> )
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	destilliertes Wasser
Her	<i>human EGFR-related receptor</i>
Herc	Herceptin
Hoe	Hoechst33258
HRG	Heregulin
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>Horseradish-Peroxidase</i> )
Igepal	(Octylphenoxy)polyethoxyethanol
IgG	Immunglobulin G
JAK	Janus Kinase
JNK	<i>c-Jun amino-terminal kinase</i>
kDa	Kilodalton
l	Liter
lin	linear
log	logarithmisch

LP	Langpassfilter ( <i>long pass filter</i> )
M	molar
mA	Milliamper
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase ( <i>mitogen activated protein kinase</i> )
min	Minute
Mio	Million
ml	Milliliter
mM	millimolar
Neu	Neuroblastom
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	optische Dichte
PAB <sup>2</sup>	PBS/ 0,01% NaN <sub>3</sub> / 2% BSA
PAB <sup>5</sup>	PBS/ 0,01% NaN <sub>3</sub> / 5% BSA
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Salzlösung ( <i>phosphat-buffered saline</i> )
PC	<i>personal computer</i>
PE	R-Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	<u>Phosphatidyl-Inositol-3'-K</u> inase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PMT	Photomultiplier ( <i>photo multiplier tube</i> )
PVDF	Polyvinylidendifluorid
pY	Phosphotyrosin
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RPMI	<i>Roosevelt Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
s	Sekunde
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecylsulfate</i> )
SH2	<i>Src-homology 2</i>
Shc	<i>SH2 domain containing transforming protein 1</i>
Shp1	<i>SH2 domain containing phosphatase 1</i>
sog.	so genannt
SP	Kurzpassfilter ( <i>short pass filter</i> )
SPF	S-Phase Fraktion
Src	Rous Sarcoma Virus Tyrosin Kinase
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht ( <i>sideward scatter light</i> )
T25, T75, T175	25-, 75-, 175-cm <sup>2</sup> Gewebe-Kulturflaschen
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TK	Tyrosin-Kinase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitmonolaurat
UFO	<i>Unidentified Function Of the protein</i>
V	Volt
v-	viral
v	Volumen
verd.	verdünnt
vgl.	vergleiche
vs	gegen ( <i>versus</i> )
WF	Wachstumsfaktor
Y	Tyrosin

## 10 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Albanell J, Codony J, Rovira A, Mellado B, Gascon P. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4. *Adv Exp Med Biol.* 532:253-268, 2003.
- (2) Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett.* 410(1):83-86, 1997.
- (3) Amtliches Publikationsorgan der Swissmedic, Schweizerisches Heilmittelinstitut, Bern. *Swissmedic Journal.* 12:1155, 2003.
- (4) Azemar M, Djahansouzi S, Jager E, Solbach C, Schmidt M, Maurer AB, Mross K, Unger C, von Minckwitz G, Dall P, Groner B, Wels WS. Regression of cutaneous tumor lesions in patients intratumorally injected with a recombinant single-chain antibody-toxin targeted to ErbB2/HER2. *Breast Cancer Res Treat.* 82(3):155-164, 2003.
- (5) Baulida J, Kraus MH, Alimandi M, Di Fiore PP, Carpenter G. All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J Biol Chem.* 271(9):5251-5257, 1996.
- (6) Ben-Levy R, Paterson HF, Marshall CJ, Yarden Y. A single autophosphorylation site confers oncogenicity to the Neu/ErbB-2 receptor and enables coupling to the MAP kinase pathway. *EMBO J.* 13(14):3302-3311, 1994.
- (7) Bertucci F, Borie N, Ginestier C, Groulet A, Charafe-Jauffret E, Adelaide J, Geneix J, Bachelart L, Finetti P, Koki A, Hermitte F, Hassoun J, Debono S, Viens P, Fert V, Jacquemier J, Birnbaum D. Identification and validation of an ERBB2 gene expression signature in breast cancers. *Oncogene.* 23(14):2564-2575, 2004.
- (8) Brandt R, Eisenbrandt R, Leenders F, Zschiesche W, Binas B, Juergensen C, Theuring F. Mammary gland specific hEGF receptor transgene expression induces neoplasia and inhibits differentiation. *Oncogene.* 19(17):2129-2137, 2000.
- (9) Braun S, auf dem Keller U, Beer HD, Krampert M, Muller M, Werner S, Dickson C, Werner S. Meeting report: growth factors in development, repair and disease. *Eur J Cell Biol.* 81(7): 375-382, 2002.
- (10) Brockhoff G. DNA und Proliferationsmessungen in der Durchflusszytometrie. In: *Angewandte Zytometrie.* Sack U, Rothe G, Tarnok A (Hrsg.). In Druck, 2004.
- (11) Brockhoff G, Heiss P, Schlegel J, Hofstaedter F, Knuechel R. Epidermal growth factor receptor, c-erbB2 and c-erbB3 receptor interaction, and related cell cycle kinetics of SK-BR-3 and BT474 breast carcinoma cells. *Cytometry.* 44(4):338-348, 2001.
- (12) Burris HA 3rd. Dual kinase inhibition in the treatment of breast cancer: initial experience with the EGFR/ErbB-2 inhibitor lapatinib. *Oncologist.* 9(Suppl 3):10-15, 2004.
- (13) Campiglio M, Ali S, Knyazev PG, Ullrich A. Characteristics of EGFR family-mediated HRG signals in human ovarian cancer. *J Cell Biochem.* 73(4):522-532, 1999.
- (14) Carpenter G. ErbB-4: mechanism of action and biology. *Exp Cell Res.* 284(1):66-77, 2003.
- (15) Chausovsky A, Waterman H, Elbaum M, Yarden Y, Geiger B, Bershadsky AD. Molecular requirements for the effect of neuregulin on cell spreading, motility and colony organization. *Oncogene.* 19(7):878-888, 2000.
- (16) Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW Jr, Leahy DJ. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature.* 421(6924):756-760, 2003.

- (17) Chow NH, Liu HS, Yang HB, Chan SH, Su IJ. Expression patterns of erbB receptor family in normal urothelium and transitional cell carcinoma. An immunohistochemical study. *Virchows Arch.* 430(6):461-466, 1997.
- (18) Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res.* 284(1):54-65, 2003.
- (19) Classen S, Possinger K, Pelka-Fleischer R, Wilmanns W. Effect of onapristone and medroxyprogesterone acetate on the proliferation and hormone receptor concentration of human breast cancer cells. *Steroid Biochem Mol Biol.* 45(4):315-319, 1993.
- (20) Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol.* 17(9):2639-2648, 1999.
- (21) Cohen S, Carpenter G, King L Jr. Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J Biol Chem.* 255(10):4834-4842, 1980.
- (22) Crissman HA, Oishi N, Habbersett R. Detection of BrdUrd-labeled cells by differential fluorescence analysis of DNA fluorochromes: pulse-chase and continuous labeling methods. In: *Methods in Cell Biology*, Vol. 41: Flow Cytometry, 2<sup>nd</sup> ed., Part A. Darzynkiewicz Z, Robinson JP, Crissman HA (eds.), Academic Press, 1994.
- (23) Daly JM, Jannot CB, Beerli RR, Graus-Porta D, Maurer FG, Hynes NE. Neu differentiation factor induces ErbB2 down-regulation and apoptosis of ErbB2-overexpressing breast tumor cells. *Cancer Res.* 57(17):3804-3811, 1997.
- (24) Data sheet #2241, Phospho-HER2/ErbB2 (Tyr877) Antibody. Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA, 2002.
- (25) Davidson RL, Kaufman ER: Resistance to bromodeoxyuridine mutagenesis and toxicity in mammalian cells selected for resistance to hydroxyurea. *Somatic Cell Genet.* 5(6):873-885, 1979.
- (26) de Bono JS, Rowinsky EK. The ErbB receptor family: a therapeutic target for cancer. *Trends Mol Med.* 8(Suppl 4):S19-26, 2002.
- (27) Diermeier S, Schmidt-Bruecken E, Kubbies M, Kunz-Schughart LA, Brockhoff G. Exposure to continuous bromodeoxyuridine (BrdU) differentially affects cell cycle progression of human breast and bladder cancer cell lines. *Cell Prolif.* 37(2):195-206, 2004.
- (28) Dolbeare F, Gratzner H, Pallavicini MG, Gray JW. Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(18):5573-5577, 1983.
- (29) Dolbeare F, Selden JR. Immunochemical quantitation of bromodeoxyuridine: application to cell-cycle kinetics. In: *Methods in Cell Biology*, Vol. 41: Flow Cytometry, 2<sup>nd</sup> ed., Part A. Darzynkiewicz Z, Robinson JP, Crissman HA (eds.), Academic Press, 1994.
- (30) Elenius K, Choi CJ, Paul S, Santiestevan E, Nishi E, Klagsbrun M. Characterization of a naturally occurring ErbB4 isoform that does not bind or activate phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene.* 18(16):2607-2615, 1999.
- (31) Elenius K, Corfas G, Paul S, Choi CJ, Rio C, Plowman GD, Klagsbrun M. A novel juxtamembrane domain isoform of HER4/ErbB4. Isoform-specific tissue distribution and differential processing in response to phorbol ester. *J Biol Chem.* 272(42):26761-26768, 1997.
- (32) Endl E. Zellzykluskinetik humaner Harnblasenkarzinomzelllinien: Charakterisierung mittels Bromodesoxyuridin-Hoechst 33258 Durchflußzytometrie. Dissertation, angefertigt am Institut für Pathologie der Universität Regensburg, 1997.

- (33) European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC).
- (34) Evan GI. The molecular basis of mammalian cell growth control. In: Flow Cytometry. Vol. H 67, Jacquemin-Sablon A (ed.), Springer-Verlag, p. 277-288, 1993.
- (35) FACS-Calibur System User's Guide. BD Biosciences, San Jose, USA, 1996.
- (36) FACStar<sup>PLUS</sup> Reference Guide. BD Biosciences, Mountain View, California, USA, 1988.
- (37) Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol.* 14(10):1649-1660, 2000.
- (38) Filmus J, Pollak MN, Cailleau R, Buick RN. MDA-468, a human breast cancer cell line with a high number of epidermal growth factor (EGF) receptors, has an amplified EGF receptor gene and is growth inhibited by EGF. *Biochem Biophys Res Commun.* 128(2):898-905, 1985.
- (39) Fischer OM, Hart S, Gschwind A, Ullrich A. EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem Soc Trans.* 31(Pt 6):1203-1208, 2003.
- (40) Förster Th. Transfer Mechanisms of Electronic Excitation. *Discuss. Faraday Soc.* 27:7-17, 1959.
- (41) Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Kofler M, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW, Ward CW. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell.* 11(2):495-505, 2003.
- (42) Gilbertson RJ, Perry RH, Kelly PJ, Pearson AD, Lunec J. Prognostic significance of HER2 and HER4 coexpression in childhood medulloblastoma. *Cancer Res.* 57(15):3272-3280, 1997.
- (43) Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* 16(7):1647-1655, 1997.
- (44) Gullick WJ. c-erbB-4/HER4: friend or foe? *J Pathol.* 200(3):279-281, 2003.
- (45) Guy PM, Platko JV, Cantley LC, Cerione RA, Carraway KL 3rd. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(17):8132-8136, 1994.
- (46) Hammock L, Lewis M, Phillips C, Cohen C. Strong HER-2/neu protein overexpression by immunohistochemistry often does not predict oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Hum Pathol.* 34(10):1043-1047, 2003.
- (47) Heiß P. Untersuchungen zur Korrelation von Interaktionen der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aus der EGFR-Familie und Zylzykluskinetiken. Diplomarbeit, angefertigt am Institut für Pathologie der Universität Regensburg, 2000.
- (48) Hendriks BS, Opresko LK, Wiley HS, Lauffenburger D. Quantitative analysis of HER2-mediated effects on HER2 and epidermal growth factor receptor endocytosis: distribution of homo- and heterodimers depends on relative HER2 levels. *J Biol Chem.* 278(26):23343-23351, 2003.
- (49) Holbro T, Beerli RR, Maurer F, Koziczak M, Barbas CF 3rd, Hynes NE. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(15):8933-8938, 2003.
- (50) Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res.* 284(1):99-110, 2003.
- (51) Honegger AM, Schmidt A, Ullrich A, Schlessinger J. Evidence for epidermal growth factor (EGF)-induced intermolecular autophosphorylation of the EGF receptors in living cells. *Mol Cell Biol.* 10(8):4035-4044, 1990.



- (52) Howard A, Pelc S. Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity*. 6(Suppl):261-273, 1953.
- (53) <http://clinicaltrials.gov>
- (54) <http://www.fda.gov>
- (55) Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res*. 284(1):31-53, 2003.
- (56) Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, Seger R, Hynes NE, Yarden Y. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J*. 15(2):254-264, 1996.
- (57) Kaufman ER, Davidson RL. Biological and biochemical effects of bromodeoxyuridine and deoxycytidine on Syrian hamster melanoma cells. *Somatic Cell Genet*. 4(5):587-601, 1978.
- (58) Keilhack H, Tenev T, Nyakatura E, Godovac-Zimmermann J, Nielsen L, Seedorf K, Bohmer FD. Phosphotyrosine 1173 mediates binding of the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 to the epidermal growth factor receptor and attenuation of receptor signaling. *J Biol Chem*. 273(38):24839-24846, 1998.
- (59) Kornfeld K. Vulval development in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Genet*. 13(2):55-61, 1997.
- (60) Krauss G. Biochemie der Regulation und Signaltransduktion. Das moderne Lehrbuch für Chemiker, Biochemiker, Biologen und Mediziner. 1. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 1997.
- (61) Kubbies M. High-resolution cell cycle analysis: the flow cytometric bromodeoxyuridine-Hoechst quenching technique. In: *Flow Cytometry and Cell Sorting*. 2<sup>nd</sup> ed., Radbruch A (ed.), Springer-Laboratory, p. 75-85, 1999.
- (62) Kubbies M. High-resolution multiparameter cell cycle analysis by BrdU/Hoechst flow cytometry. In: *Progress in cytometry: flow and image. Reports from the 3<sup>rd</sup> European cytometry users conference 1989 in Ghent, Belgium*. Becton Dickinson (eds.), 1990.
- (63) Kubbies M, Hoehn H, Schindler D, Chen Y, Rabinovitch PS. Cell cycle analysis via BrdU-Hoechst flow cytometry: principles and applications. In: *Flow Cytometry: Advanced Research and Clinical Application. Volume II*, Yen A (ed.), CRS-Press, Florida, p. 5-28, 1989.
- (64) Kumar R, Mandal M, Ratzkin BJ, Liu N, Lipton A. NDF induces expression of a novel 46 kD protein in estrogen receptor positive breast cancer cells. *J Cell Biochem*. 62(1):102-112, 1996.
- (65) Kwon YK, Bhattacharyya A, Alberta JA, Giannobile WV, Cheon K, Stiles CD, Pomeroy SL. Activation of ErbB2 during wallerian degeneration of sciatic nerve. *J Neurosci*. 17(21):8293-8299, 1997.
- (66) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(259):680-685, 1970.
- (67) Lajtha LG. On the concept of cell cycle. *J Cell Physiol*. 62(Suppl 1):143-145, 1963.
- (68) Laskin JJ, Sandler AB. Epidermal growth factor receptor: a promising target in solid tumours. *Cancer Treat Rev*. 30(1):1-17, 2004.
- (69) Latt SA, George YS, Gray JW. Flow cytometric analysis of bromodeoxyuridine-substituted cells stained with 33258 Hoechst. *J Histochem Cytochem*. 25(7):927-934, 1977.
- (70) Latt SA. Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 70(12):3395-3399, 1973.
- (71) Latt SA, Wohlleb JC. Optical studies of the interaction of 33258 Hoechst with DNA, chromatin, and metaphase chromosomes. *Chromosoma*. 52(4):297-316, 1975.

- (72) Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, Katz M, Tsygankov AY, Alroy I, Lavi S, Iwai K, Reiss Y, Ciechanover A, Lipkowitz S, Yarden Y. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell.* 4(6):1029-1040, 1999.
- (73) Lewis GD, Lofgren JA, McMurtrey AE, Nuijens A, Fendly BM, Bauer KD, Sliwkowski MX. Growth regulation of human breast and ovarian tumor cells by heregulin: Evidence for the requirement of ErbB2 as a critical component in mediating heregulin responsiveness. *Cancer Res.* 56(6):1457-1465, 1996.
- (74) Lodge AJ, Anderson JJ, Gullick WJ, Haugk B, Leonard RC, Angus B. Type 1 growth factor receptor expression in node positive breast cancer: adverse prognostic significance of c-erbB-4. *J Clin Pathol.* 56(4):300-304, 2003.
- (75) Loontjens FG, McLaughlin LW, Diekmann S, Clegg RM. Binding of Hoechst 33258 and 4',6'-diamidino-2-phenylindole to self-complementary decadeoxynucleotides with modified exocyclic base substituents. *Biochemistry.* 30(1):182-189, 1991.
- (76) Loontjens FG, Regenfuss P, Zechel A, Dumortier L, Clegg RM. Binding characteristics of Hoechst 33258 with calf thymus DNA, poly[d(A-T)], and d(CCGGAATTCCGG): multiple stoichiometries and determination of tight binding with a wide spectrum of site affinities. *Biochemistry.* 29(38):9029-9039, 1990.
- (77) Lui VW, Grandis JR. EGFR-mediated cell cycle regulation. *Anticancer Res.* 22(1A):1-11, 2002.
- (78) Lupu R, Colomer R, Zugmaier G, Sarup J, Shepard M, Slamon D, Lippman ME. Direct interaction of a ligand for the erbB2 oncogene product with the EGF receptor and p185erbB2. *Science.* 249(4976):1552-1555, 1990.
- (79) MacLeod CL, Luk A, Castagnola J, Cronin M, Mendelsohn J. EGF induces cell cycle arrest of A431 human epidermoid carcinoma cells. *J Cell Physiol.* 127(1):175-182, 1986.
- (80) Mamot C. Anti-EGFR-Immunoliposomen – Liposomen der nächsten Generation. *Schweiz Med Forum.* 37:876-879, 2003.
- (81) Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 58(3):903-913, 2004.
- (82) Massague J, Pandiella A. Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem.* 62:515-541, 1993.
- (83) Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol.* 21(14):2787-2799, 2003.
- (84) Meyer RD, Rahimi N. Comparative structure-function analysis of VEGFR-1 and VEGFR-2: What have we learned from chimeric systems? *Ann N Y Acad Sci.* 995:200-207, 2003.
- (85) Mokbel K, Hassanally D. From HER2 to herceptin. *Curr Med Res Opin.* 17(1):51-59, 2001.
- (86) Motoyama AB, Hynes NE, Lane HA. The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res.* 62(11):3151-3158, 2002.
- (87) Moulder SL, Arteaga CL. A Phase I/II Trial of trastuzumab and gefitinib in patients with Metastatic Breast Cancer that overexpresses HER2/neu (ErbB-2). *Clin Breast Cancer.* 4(2):142-145, 2003.
- (88) Moulder SL, Yakes FM, Muthuswamy SK, Bianco R, Simpson JF, Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 61(24):8887-8895, 2001.
- (89) Nagy P, Jenei A, Kirsch AK, Szollosi J, Damjanovich S, Jovin TM. Activation-dependent clustering of the erbB2 receptor tyrosine kinase detected by scanning near-field optical microscopy. *J Cell Sci.* 112 (Pt 11):1733-1741, 1999.

- (90) Nagy P, Bene L, Balazs M, Hyun WC, Lockett SJ, Chiang NY, Waldman F, Feuerstein BG, Damjanovich S, Szollosi J. EGF-induced redistribution of erbB2 on breast tumor cells: flow and image cytometric energy transfer measurements. *Cytometry*. 32(2):120-131, 1998.
- (91) Nahta R, Hung MC, Esteva FJ. The HER-2-targeting antibodies trastuzumab and pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells. *Cancer Res*. 64(7):2343-2346, 2004.
- (92) Ni CY, Murphy MP, Golde TE, Carpenter G. gamma-Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science*. 294(5549):2179-2181, 2001.
- (93) Normanno N, Bianco C, De Luca A, Maiello MR, Salomon DS. Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr Relat Cancer*. 10(1):1-21, 2003.
- (94) Olayioye MA, Graus-Porta D, Beerli RR, Rohrer J, Gay B, Hynes NE. ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol*. 18(9):5042-5051, 1998.
- (95) Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*. 19(13):3159-3167, 2000.
- (96) Ormerod MG, Kubbies M. Cell cycle analysis of asynchronous cell populations by flow cytometry using bromodeoxyuridine label and Hoechst-propidium iodide stain. *Cytometry*. 13(7):678-685, 1992.
- (97) Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 71(4):1286-1290, 1974.
- (98) Pauletti G, Dandekar S, Rong H, Ramos L, Peng H, Seshadri R, Slamon DJ. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Oncol*. 18(21):3651-3664, 2000.
- (99) Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene*. 13(1):63-72, 1996.
- (100) Pinkas-Kramarski R, Lenferink AE, Bacus SS, Lyass L, van de Poll ML, Klapper LN, Tzahar E, Sela M, van Zoelen EJ, Yarden Y. The oncogenic ErbB-2/ErbB-3 heterodimer is a surrogate receptor of the epidermal growth factor and betacellulin. *Oncogene*. 16(10):1249-1258, 1998.
- (101) Pinkas-Kramarski R, Shelly M, Glathe S, Ratzkin BJ, Yarden Y. Neu differentiation factor/neuregulin isoforms activate distinct receptor combinations. *J Biol Chem*. 271(32):19029-19032, 1996.
- (102) Pledger WJ, Stiles CD, Antoniades HN, Scher CD. An ordered sequence of events is required before BALB/c-3T3 cells become committed to DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 75(6):2839-2843, 1978.
- (103) Poot M, Hoehn H, Kubbies M, Grossmann A, Chen Y, Rabinovitch PS. Cell-cycle analysis using continuous bromodeoxyuridine labeling and Hoechst 33358-ethidium bromide bivariate flow cytometry. *Methods Cell Biol*. 41:327-340, 1994.
- (104) Poot M, Schindler D, Kubbies M, Hoehn H, Rabinovitch PS. Bromodeoxyuridine amplifies the inhibitory effect of oxygen on cell proliferation. *Cytometry*. 9(4):332-338, 1988.
- (105) Rabinovitch PS. Practical considerations for DNA content and cell cycle analysis. In: *Clinical Flow Cytometry*. 1<sup>st</sup> ed., Bauer KD, Duque RE, Shankey TV (eds.). John Wiley, Inc., New York, p. 157-175, 1993.
- (106) Rabinovitch PS. Regulation of human fibroblast growth rate by both noncycling cell fraction transition probability is shown by growth in 5-bromodeoxyuridine followed by Hoechst 33258 flow cytometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 80(10):2951-2955, 1983.

- (107) Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 9(2):180-186, 1997.
- (108) Roskoski R Jr. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 319(1):1-11, 2004.
- (109) Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 19(3):183-232, 1995.
- (110) Sarup JC, Johnson RM, King KL, Fendly BM, Lipari MT, Napier MA, Ullrich A, Shepard HM. Characterization of an anti-p185HER2 monoclonal antibody that stimulates receptor function and inhibits tumor cell growth. *Growth Regul.* 1(2):72-82, 1991.
- (111) Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 103(2):211-225, 2000.
- (112) Scott GK, Dodson JM, Montgomery PA, Johnson RM, Sarup JC, Wong WL, Ullrich A, Shepard HM, Benz CC. p185HER2 signal transduction in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 266(22):14300-14305, 1991.
- (113) Sebestyen Z, Nagy P, Horvath G, Vamosi G, Debets R, Gratama JW, Alexander DR, Szollosi J. Long wavelength fluorophores and cell-by-cell correction for autofluorescence significantly improves the accuracy of flow cytometric energy transfer measurements on a dual-laser benchtop flow cytometer. *Cytometry.* 48(3):124-135, 2002.
- (114) Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 235(4785):177-182, 1987.
- (115) Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 344(11):783-792, 2001.
- (116) Slamon DJ. The FUTURE of ErbB-1 and ErbB-2 pathway inhibition in breast cancer: targeting multiple receptors. *Oncologist.* 9(Suppl 3):1-3, 2004.
- (117) Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD, Hotaling TE, Fendly BM, Fox JA. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol.* 26(4 Suppl 12):60-70, 1999.
- (118) Smith BL, Chin D, Maltzman W, Crosby K, Hortobagyi GN, Bacus SS. The efficacy of Herceptin therapies is influenced by the expression of other erbB receptors, their ligands and the activation of downstream signalling proteins. *Br J Cancer.* In Press, 2004.
- (119) Smith JA, Martin L. Do cell cycle? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 70(4):1263-1267, 1973.
- (120) Spiridon CI, Ghetie MA, Uhr J, Marches R, Li JL, Shen GL, Vitetta ES. Targeting multiple Her-2 epitopes with monoclonal antibodies results in improved antigrowth activity of a human breast cancer cell line in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 8(6):1720-1730, 2000.
- (121) Srinivasan R, Poulsom R, Hurst HC, Gullick WJ. Expression of the c-erbB-4/HER4 protein and mRNA in normal human fetal and adult tissues and in a survey of nine solid tumour types. *J Pathol.* 185(3):236-245, 1998.
- (122) Stern DF. ErbBs in mammary development. *Exp Cell Res.* 284(1):89-98, 2003.
- (123) Suo Z, Risberg B, Kalsson MG, Willman K, Tierens A, Skovlund E, Nesland JM. EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. *J Pathol.* 196(1):17-25, 2002.
- (124) Suo Z, Nesland JM. Type 1 protein tyrosine kinases in breast carcinoma: a review. *Ultrastruct Pathol.* 26(3):125-135, 2002.

- (125) Sutherland RL, Hall RE, Pang GY, Musgrove EA, Clarke CL. Effect of medroxyprogesterone acetate on proliferation and cell cycle kinetics of human mammary carcinoma cells. *Cancer Res.* 48(18):5084-5091, 1988.
- (126) Sweeney C, Carraway KL 3rd. Negative regulation of ErbB family receptor tyrosine kinases. *Br J Cancer.* 90(2):289-293, 2004.
- (127) Szentesi G, Horvath G, Bori I, Vamosi G, Szollosi J, Gaspar R, Damjanovich S, Jenei A, Matyus L. Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. *Comput Methods Programs Biomed.* 75(3):201-211, 2004.
- (128) Szollosi J, Balazs M, Feuerstein BG, Benz CC, Waldman FM. ERBB-2 (HER2/neu) gene copy number, p185HER-2 overexpression, and intratumor heterogeneity in human breast cancer. *Cancer Res.* 55(22):5400-5407, 1995.
- (129) Szollosi J, Damjanovich S, Mulhern SA, Tron L. Fluorescence energy transfer and membrane potential measurements monitor dynamic properties of cell membranes: a critical review. *Prog Biophys Mol Biol.* 49(2-3):65-87, 1987.
- (130) Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell.* 42(2):581-588, 1985.
- (131) The Purdue Cytometry CD-ROM. Vol 3, Parker J, Stewart C, (guest eds.), Robinson JP, (publisher), Purdue University, West Lafayette, 1997.
- (132) Tikhomirov O, Carpenter G. Ligand-induced, p38-dependent apoptosis in cells expressing high levels of epidermal growth factor receptor and ErbB-2. *J Biol Chem.* 279(13):12988-12996, 2004.
- (133) Timms JF, White SL, O'Hare MJ, Waterfield MD. Effects of ErbB-2 overexpression on mitogenic signalling and cell cycle progression in human breast luminal epithelial cells. *Oncogene.* 21(43):6573-6586, 2002.
- (134) Tovey SM, Witton CJ, Bartlett JM, Stanton PD, Reeves JR, Cooke TG. Outcome and human epidermal growth factor receptor (HER) 1-4 status in invasive breast carcinomas with proliferation indices evaluated by bromodeoxyuridine labelling. *Breast Cancer Res.* 6(3):R246-251, 2004.
- (135) Tron L, Szollosi J, Damjanovich S, Helliwell SH, Arndt-Jovin DJ, Jovin TM. Flow cytometric measurement of fluorescence resonance energy transfer on cell surfaces. Quantitative evaluation of the transfer efficiency on a cell-by-cell basis. *Biophys J.* 45(5):939-946, 1984.
- (136) Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Kataoka A, Kinoshita J, Hachitanda Y. Prognostic value of the combination of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 in breast cancer. *Surgery.* 133(2):219-221, 2003.
- (137) Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunagaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol.* 16(10):5276-5287, 1996.
- (138) Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J, et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature.* 309(5967):418-425, 1984.
- (139) Vereb G, Szollosi J, Matko J, Nagy P, Farkas T, Vigh L, Matyus L, Waldmann TA, Damjanovich S. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(14):8053-8058, 2003.
- (140) Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 184(1):39-51, 1995.

- (141) Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 20(3):719-726, 2002.
- (142) Waggoner AS. Fluorescent probes for cytometry. In: *Flow Cytometry and Sorting*. 2<sup>nd</sup> ed., Melamed MR, Mendelsohn ML (eds.), Wiley & Sons, New York, 1990.
- (143) Wallasch C, Weiss FU, Niederfellner G, Jallal B, Issing W, Ullrich A. Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *EMBO J.* 14(17):4267-4275, 1995.
- (144) Wiley HS. Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. *Exp Cell Res.* 284(1):78-88, 2003.
- (145) Wilson GD. Analysis of DNA-measurement of cell kinetics by the bromodeoxyuridine/anti-bromodeoxyuridine method. In: *Flow Cytometry: A Practical Approach*. 2<sup>nd</sup> ed., Ormerod MG (ed.), Oxford University Press, 1994.
- (146) Witton CJ, Reeves JR, Going JJ, Cooke TG, Bartlett JM. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol.* 200(3):290-297, 2003.
- (147) Worthylake R, Wiley HS. Structural aspects of the epidermal growth factor receptor required for transmodulation of erbB-2/neu. *J Biol Chem.* 272(13):8594-8601, 1997.
- (148) Xia L, Wang L, Chung AS, Ivanov SS, Ling MY, Dragoi AM, Platt A, Gilmer TM, Fu XY, Chin YE. Identification of both positive and negative domains within the epidermal growth factor receptor COOH-terminal region for signal transducer and activator of transcription (STAT) activation. *J Biol Chem.* 277(34):30716-30723, 2002.
- (149) Yamauchi T, Ueki K, Tobe K, Tamemoto H, Sekine N, Wada M, Honjo M, Takahashi M, Takahashi T, Hirai H, Tushima T, Akanuma Y, Fujita T, Komuro I, Yazaki Y, Kadowaki T. Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone. *Nature.* 390(6655):91-96, 1997.
- (150) Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(2):127-137, 2001.
- (151) Ye D, Mendelsohn J, Fan Z. Augmentation of a humanized anti-HER2 mAb 4D5 induced growth inhibition by a human-mouse chimeric anti-EGF receptor mAb C225. *Oncogene.* 18(3):731-738, 1999.
- (152) Zetterberg A, Larsson O. Cell cycle progression and cell growth in mammalian cells: Kinetic aspects of transition events. In: *Frontiers in molecular biology: Cell cycle control*. Hutchinson C, Glover DM (eds.), Oxford University Press, p. 206-227, 1995.
- (153) Zhang Y, Zhang YF, Bryant J, Charles A, Boado RJ, Pardridge WM. Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin Cancer Res.* 10(11):3667-3677, 2004.
- (154) Zwick E, Bange J, Ullrich A. Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. *Trends Mol Med.* 8(1):17-23, 2002.

## DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Dr. Gero Brockhoff für die interessante Themenstellung, die hervorragende Betreuung mit kreativen Diskussionen sowie vielen richtungsweisenden Ratschlägen.

Ich danke Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Pathologie durchführen zu können, und die stete Unterstützung zur Fort- und Weiterbildung in Bezug auf mein Projekt.

Prof. Dr. Claudia Steinem möchte ich danken für die Übernahme der Begutachtung und die Bereitschaft, diese Arbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV, Chemie und Pharmazie, zu vertreten.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Ruth Knüchel-Clarke für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und ihr fortwährendes Interesse an meiner Dissertation trotz ihres Fortgangs an das Uniklinikum Aachen.

Mein besonderer Dank geht an Elisabeth Schmidt-Brücken für ihre hervorragende Assistenz bei der Durchführung der Experimente und die qualifizierte Hilfestellung in der Zellkultur. Ebenso möchte ich mich herzlich bei Rosi Kromas für die Einweisung in die Zellkulturtechnik und ihre stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken.

PD Dr. Leoni Kunz-Schughart möchte ich danken für die Unterstützung am FACStar<sup>PLUS</sup>, so manche Korrektur von englischsprachigem Text und die vielen guten Gespräche. Dank auch an Marit Wondrak für die Einweisung in die Handhabung des FACStar<sup>PLUS</sup>. Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Christian Lottner für die Überlassung von immunhistochemischen Aufnahmen.

Prof. Dr. J. Szöllösi und G. Horváth (Universität Debrecen, Ungarn) gilt mein Dank für die Einweisung in die FRET-Technik und für die Gastfreundschaft an ihrem Institut, die unermüdliche Bereitschaft zur Diskussion und die Versorgung mit Farbstoff-markierten Antikörpern.

Mein Dank gilt auch Guido Piontek von der TU-München, der für Fragestellungen zu SDS-PAGE und Western-Blotting ein kompetenter Ratgeber war. Dank an ihn auch für die überlassenen Antikörperproben.

Mein allgemeiner Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre.